

Uso de sensor óptico no estudo de sistemas microfluídicos com, e sem, adsorção biomolecular

Fernanda Cecilia Correia Lima Loureiro

Tese de Doutorado submetida à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande - Campus de Campina Grande como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências no Domínio da Engenharia Elétrica.

Área de Concentração: Processamento da Informação

Dr. Antonio Marcus Nogueira Lima

Dr. Helmut Neff

Orientadores

Campina Grande, Paraíba, Brasil

©Fernanda Cecilia Correia Lima Loureiro, Janeiro de 2015

Uso de sensor óptico no estudo de sistemas
microfluídicos com, e sem, adsorção biomolecular

Fernanda Cecilia Correia Lima Loureiro

Tese de Doutorado apresentada em Janeiro de 2015

Dr. Antonio Marcus Nogueira Lima

Dr. Helmut Neff

Orientadores

Campina Grande, Paraíba, Brasil, Janeiro de 2015

Dedicatória

*Dedico este trabalho,
em especial, aos meus filhos Clarissa Fernanda, Arthur Cesar e Ricardo Augusto,
e ao meu esposo Ricardo Jorge (in memoriam).
Aos meus pais Antonio e Maria de Lourdes Correia Lima (in memoriam).
À minha tia Maria Dulce Barbosa-Titá (in memoriam).
Aos meus irmãos Germana, Ricardo, Eduardo (in memoriam), Margarida e Emília
e a toda minha família, pelo apoio sempre presente.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, direta ou indiretamente, em especial ao Prof. Dr. Helmut Neff pela orientação e inestimável ajuda, essencial para o desenvolvimento do mesmo, ao Prof. Dr. Antonio Marcus Nogueira Lima pela orientação e suporte, ao Prof. Dr. Hervé Laborde e ao Dr. Arlindo pelas colaborações, a Leiva, Alfranke e a Lucimar pelo apoio e amizade, a minha sobrinha Ana Cecília pelas criativas animações, aos meus filhos e familiares pela compreensão e incentivo, e às instituições FIOCRUZ, FMTAM, CNPQ, empresa JABIL e aos Laboratórios clínicos locais Hemoclin, Prontanálise e Promédica, pelo suporte material.

Resumo

A microfluídica aliada à optofluídica é um campo emergente com importantes aplicações em biotecnologia e química analítica e que precisa de um maior estudo para o desenvolvimento de dispositivos analíticos miniaturizados. Este trabalho tem como objetivo estudar sistemas microfluídicos, através de métodos experimentais, usando biossensores ópticos e, em especial, aqueles baseados na tecnologia de ressonância de plasmon de superfície (SPR). A tecnologia SPR permite a determinação dos parâmetros de transporte, bem como o monitoramento de interações moleculares. Neste estudo, foram utilizadas células microfluídicas (altura de 0,75 e 1 mm e volume de 7 e 11 μl) na qual um sensor SPR é integrado. Esta integração permitiu a proposição de: 1) um método para avaliar quantitativamente os parâmetros de transporte, tais como a velocidade de escorregamento e coeficiente de difusão molecular e 2) um método para avaliar as constantes cinéticas e termodinâmicas de ligações de substâncias (biotina, proteínas globulares, soro humano) na superfície sensível do biossensor. Estes resultados permitem melhorar o projeto experimental de imunoenaios, em termos da escolha das substâncias mais adequadas para a camada de imobilização, do volume de analito, e do limiar de detecção, tendo em vista o desenvolvimento de um sistema para detecção de afinidade em reações antígeno-anticorpo, com ênfase especial na detecção do vírus da dengue (DENV).

Palavras chave: sistemas microfluídicos, biossensores, ressonância de plasmon de superfície, imunoenaios, antígenos, anticorpos.

Abstract

This work aims to study microfluidic systems, through experimental methods, using optical biosensors, more especially, surface plasmons resonance (SPR) technology based sensors. The microfluidic area and biotechnology advancement has enabled the development of microsystems that can potentially be used in public health to supply demands for portable and low cost diagnostic devices. However, microfluidic science still requires greater knowledge of fluid devices properties and performance, when reduced from macro to micro scales. Here a method is proposed for real-time monitoring of SPR surface changes as a novel and important tool of analysis for molecular interaction assays and system performance. On this study one microfluidic cell integrated with a SPR sensor is used. This proposed system enables reduction of samples diffusion time and volume allied with SPR sensor advantages of higher precision and sensitivity. The well defined detection range of refractive index changes, at the SPR sensor surface, guarantees high precision measurements. Here, we perform quantitative assessments of transport parameters, such as slip-flow and convective-diffusion flow velocity as a means to optimize system performance parameters. More specifically, we can evaluate qualitatively and quantitatively the kinetic and thermodynamic properties of biotin and proteins with great reliability. Preliminary immunoassays results allow further development of SPR immunosensors applications for affinity detection in antigen-antibody reactions, with special emphasis on dengue virus (DENV) detection and serotype identification.

Keywords: microfluidic systems, surface plasmon resonance, immunoassays, antigen-antibody reactions.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Justificativa	1
1.2	Objetivos	6
1.3	Revisão bibliográfica	7
1.3.1	Sistemas microfluídicos	7
1.3.2	Tecnologia SPR	9
1.3.3	Adsorção e interações moleculares	12
1.3.4	Técnicas para detecção do vírus dengue	12
1.4	Organização do trabalho	14
2	Fundamentos teóricos	15
2.1	Fundamentos teóricos da micro-fluidodinâmica	15
2.2	Hidrodinâmica da difusividade molecular	18
2.3	Biossensores	22
2.4	Tecnologia de biossensores SPR	25
2.4.1	Princípio dos sensores ópticos - SPR	25
2.4.2	Sensor SPR integrado à célula microfluídica	27
2.4.3	Modelo de Fresnel para o sistema de detecção SPR	30
2.5	Princípios de imunologia	34
2.5.1	Antígenos	35
2.5.2	Anticorpos	36
2.5.3	Interação antígeno- anticorpo	40
2.5.4	Métodos de diagnósticos da presença de vírus	41

2.5.5	Características do vírus dengue	42
2.6	Imunoensaios	43
2.7	Mecanismos de adsorção e interações moleculares	45
2.7.1	Técnicas de imobilização em superfícies sólidas	45
2.7.2	Modelos de adsorção na superfície de metal de um biossensor	47
2.8	Considerações finais do capítulo	57
3	Análise dos sistemas microfluídicos sem adsorção	58
3.1	Método para determinação das condições de fluxo	58
3.1.1	Motivação	58
3.1.2	Plataforma experimental	61
3.1.3	Método experimental	64
3.1.4	Descrição dos experimentos	67
3.1.5	Resultados e discussão	67
3.2	Método para determinação do coeficiente de difusão mútuo de soluções moleculares	74
3.2.1	Método de Detecção	76
3.2.2	Montagem e procedimentos experimentais	83
3.2.3	Simulação da hidrodinâmica na célula microfluídica	86
3.2.4	Resultados	87
3.2.5	Discussão dos resultados	95
3.2.6	Considerações finais do capítulo	97
4	Análise dos sistemas microfluídicos com adsorção na superfície de detecção	98
4.1	Método para análise da cinética de adsorção da biotina	99
4.1.1	Detalhamento do método e materiais	100
4.1.2	Discussão dos experimentos	102
4.1.3	Análise das interações bioquímicas da biotina com neutravidina e soro humano	107
4.1.4	Análise de adsorção da biotina por aproximação do modelo de Langmuir por uma exponencial (AML)	111
4.2	Método para análise dos mecanismos de adsorção de proteínas globulares	112

4.2.1	Métodos e materiais	114
4.2.2	Resultados parciais e discussão	116
4.3	Prova de conceito do método de diagnóstico e identificação do vírus dengue . . .	126
4.3.1	Motivação e relevância do método	127
4.3.2	Objetivo	128
4.3.3	Descrição do método proposto	129
4.3.4	Apresentação e discussão dos resultados dos imunoenaios	138
5	Conclusão	145
5.1	Determinação dos parâmetros de transporte sem adsorção na superfície de detecção	145
5.2	Análise cinética e termodinâmica da adsorção na superfície de detecção	147
5.3	Síntese das conclusões	148
5.4	Contribuições	150
5.5	Perspectivas de trabalhos futuros	150
	Referências Bibliográficas	152

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Ab (*Antibody*) *Anticorpo.*

AFM (*Atomic force microscopy*) *Microscopia de força atômica.*

Ag (*Antigen*) *Antígeno.*

BSA (*Bovine serum albumin*) *Albumina sérica bovina.*

CRP (*C reactive protein*) *Proteína C reativa.*

Da *Dalton.*

DENV *Vírus dengue.*

DF *Febre da dengue.*

DHF *Febre hemorrágica da dengue.*

DNA *Ácido desoxirribonucleico.*

DSP (*Disease specific protein*) *Proteína específica de doença.*

DSS *Síndrome de choque da dengue.*

ECD *Equação convectivo-difusiva.*

ELISA *Ensaio imunoenzimático.*

ENS *Equação de Navier Stokes.*

FFF *Fracionamento por fluxo de campo.*

FWHM (*Full width at half maximum*) *Largura à meia altura máxima.*

G-ACM *Modelo generalizado de adsorção cinética molecular.*

hsPCR *Proteína C reativa ultra-sensível.*

PCRu *Proteína C reativa ultra-sensível.*

IgG *Imunoglobulina classe G.*

IUPAC *União Internacional de Química Pura e Aplicada*

M *Mol - quantidade de matéria de um sistema que contém tantas entidades elementares quanto são os átomos contidos em 0,012 quilograma de carbono-12.*

MAb *Anticorpo monoclonal.*

MABBi *Anticorpo monoclonal biotinizado.*

ML *Monocamada de adsorção.*

NA *Neutravidina.*

NMR *Ressonância magnética nuclear.*

NS1 *Proteína não estrutural 1.*

OCP *Potencial de circuito aberto.*

PBS (*Phosphate buffer solution*) *Solução salina tampão de fosfato.*

pH *Potencial de Hidrogênio.*

PIM *Polímeros de impressão molecular.*

PIV *Velocimetria por imagem de partículas.*

PNA *Ácido nucleico peptídico.*

POC *Ponto de atendimento.*

PSA *Antígeno prostático específico.*

RIU *Unidade de índice de refração.*

RNA *Ácido ribonucleico.*

RT-PCR *Reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa.*

SAM *Monocamadas auto-organizadas.*

SPR *Ressonância de plasmon de superfície.*

SPWs (*Surface plasmon waves*) *Ondas de plasmon de superfície.*

TEM (*Transmission electron microscopy*) *Microscopia de transmissão de elétrons de alta resolução.*

Lista de Tabelas

2.1	Classificação dos vírus dengue	43
3.1	Resultados do método de detecção direta com a solução etanol-água.	89
3.2	Resultados experimentais pelo Método de Taylor, Detecção Direta e da Literatura.	96
4.1	Constantes dielétricas e espessuras utilizados na presente análise.	102
4.2	Parâmetros cinéticos para a adsorção de biotina e de diferentes compostos de tiol no ouro.	106

Lista de Figuras

2.1	Célula microfluídica com canal retangular.	15
2.2	Diagrama esquemático com os componentes principais de um biossensor. Figura adaptada de [78]	23
2.3	Princípio de ressonância do plasmon de superfície	26
2.4	Sistema detector SPR - célula microfluídica com sensor, prisma, fonte de luz e câmera	28
2.5	Construção do sensorgrama a partir das curvas SPR - a cada mudança do ângulo de ressonância θ_{res} corresponde um valor de índice de refração n . .	29
2.6	Modelo de sensorgrama - indicação, do monitoramento no tempo, da vari- ação do índice de refração para cada etapa de admissão de substâncias na célula de fluxo do sensor.	30
2.7	Configuração de Kretschmann de uma interface de três camadas: sensoriamento- prisma-metal. θ é o ângulo de incidência e d é a espessura do filme metálico. Figura adaptada de [86]	31
2.8	Configuração de interface de quatro camadas para um sensor SPR. Figura adaptada de [26]	33
2.9	a) Configuração de quatro camadas para a excitação de plasmon de super- fície com os índices de refração, constantes dielétricas e as espessuras das camadas indicados. b) Índice de refração eficaz em função da espessura. Figura adaptada de [26]	34
2.10	Respostas dos anticorpos, em função do tempo, às injeções primária e se- cundária de determinado antígeno. Gráfico adaptado de [87]	37

2.11	Estrutura do anticorpo IgG com duas cadeias pesadas e duas leves. Figura adaptada de [87]	39
2.12	Interação entre um antígeno e anticorpos específicos correspondentes. Figura adaptada de [87]	40
2.13	Formação de hibridomas e produção de anticorpos monoclonais. Figura adaptada de [87]	42
2.14	a) Vírus dengue (DENV) b) Ilustração da estrutura de um vírus. No realce o nucleocapsídeo formado por capsômeros. Figura adaptada de [15]	42
2.15	Ilustração do processo de adsorção em interface sólido-líquido formando monocamada ou multicamada. Estão indicadas as etapas: 1)ligação da molécula na superfície; 2) dessorção da molécula	48
2.16	Ilustração de um exemplo de etapas de adsorção de proteínas: a) transporte de proteínas para a superfície b) ligação com o eixo maior paralelo à superfície c) rearranjo com aumento da interação e concentração de proteínas. . .	49
2.17	Exemplo de isoterma de Langmuir.	49
2.18	Ilustração de uma célula microfluídica com fluxo de solução de proteínas em contato com a superfície. A direção Z é definida perpendicular à superfície e sendo X a direção do fluxo na célula microfluídica.	50
2.19	Ilustração do crescimento da cobertura pelos Modelos Langmuir (L-TAM), RSA (ORSAM), irreversível RSA (IRSAM) e cinética molecular (G-KAM).	57
3.1	Ilustração do perfil de velocidade ideal e comprimentos de escorregamento positivo e negativo.	59
3.2	(a) e (b) - Perfis de velocidade e desvios medidos com a técnica PIV [9]. . .	60
3.3	Plataforma de ensaio com microchaves, microbomba, célula de fluxo com transdutor acoplado e um microcomputador para processamento e controle.	62
3.4	Célula microfluídica com sensor SPR.	63
3.5	Faixa de penetração do campo evanescente.	63
3.6	Função degrau da concentração do soluto como sinal de entrada e variação temporal do índice de refração como sinal de saída.	64
3.7	Ilustração da determinação do tempo de resposta difusivo, τ_{Diff} , para $f \rightarrow 0$	66

3.8	Resposta transitória da variação do índice de refração $\Delta n(t)$ bem próximo à parede do canal: a) para solução 0.1 molar de NaOH - apenas um tempo de subida. b) para solução de 0.006 molar de NaOH - dois diferentes tempos de subida.	68
3.9	Tempo de resposta, transitório, $\Delta\tau_{tot}$, da variação do índice de refração, próximo às paredes, em função da concentração c (log-log).	69
3.10	Variação e forma da parte dinâmica da ECD; $\frac{\Delta c}{\Delta\tau_{tot}}$ em função da concentração c	70
3.11	Velocidade média do fluxo próximo à superfície, obtida experimentalmente, em função da velocidade uniforme aplicada V_u	71
3.12	Velocidade V_{HD} em função da distância ao centro da célula de fluxo.	72
3.13	Variação do tempo de resposta SPR em função da velocidade de fluxo uniforme aplicada. Na janela é mostrada essa variação para um perfil de fluxo parabólico ideal.	72
3.14	Forma e variação da parte dinâmica da CDE, $\frac{\Delta c}{\Delta\tau}$, em função da taxa de volume de fluxo. Na janela é traçado o tempo de resposta (SPR) em função da taxa de fluxo.	73
3.15	Célula microfluídica.	77
3.16	Diagrama do sistema com entrada e saída.	78
3.17	Ilustração da célula microfluídica e da resposta na saída do sensor SPR, ao ser aplicado um degrau de concentração do soluto, na célula de fluxo. Uma bolha de ar, indicada pela faixa branca, separa o soluto do solvente.	79
3.18	Evolução de $\frac{\Delta c}{\Delta\tau_{tot}}$ em função da taxa de fluxo, f . Na janela a variação do índice de refração (RI) em função do tempo, onde $\tau = \tau_{tot}$	80
3.19	Esquema da distorção de um soluto ao longo do tubo em um experimento de Taylor. Na parte inferior da figura são mostrados os modelos de perfis de concentração aproximados em cada estágio do experimento.	82
3.20	O perfil gaussiano da concentração, proporcional ao índice de refração, é detectado pelo sensor SPR acoplado à célula de fluxo.	82
3.21	Instrumento VIR: a) diagrama do sensor VIR com mostrador automático; b) foto do instrumento VIR.	84

3.22	a) Imagem da câmera e b) Curva SPR da intensidade da luz em função do ângulo em graus C.	85
3.23	Variação do índice de refração medido experimentalmente para a solução 5% etanol-água.	87
3.24	Solução de etanol-água medida com Instrumento VIR-SPR.	88
3.25	Gráfico da resposta dinâmica $\Delta c/\Delta\tau_{tot}$ em função da taxa de fluxo.	89
3.26	a) $\Delta c/\Delta\tau$ em função da taxa de fluxo e b) τ_{tot} em função da taxa de fluxo.	90
3.27	Resultados experimentais do Método de Dispersão de Taylor para uma solução de 5% (v/v) de ethanol diluído em água.	91
3.28	Resultado experimental Método de Taylor- Solução a 10%(4g/l) de BSA-água.	91
3.29	Outro resultado do método de Taylor para BSA-água.	92
3.30	Mais um exemplo de medição com o Método de Taylor para BSA.	92
3.31	Distribuição da concentração na célula de fluxo - a) A secção circular ampliada confirma o transporte difusivo unidimensional no centro da célula de fluxo. b) Representação em falsas cores da distribuição de concentração.	93
3.32	Perfil Gaussiano inicial da concentração entre as paredes da célula de fluxo depois de 5s. Na janela é ilustrada mudança no perfil de concentração depois de 15 e 26s.	93
3.33	Evolução temporal da concentração do soluto (0,852mol/l) para vários coeficientes de difusão, calculados próximo à parede a uma distância de 0,5 μ m, pela combinação das equações CDE e NSE para um perfil retangular de concentração.	94
3.34	Resultados da simulação para a combinação da CDE com a NSE para o δ -pulso de entrada de 3s para uma solução de 5% etanol-água. O atraso do pulso é de 30s. O tempo de transporte t_p está indicado.	95
3.35	Resultados da simulação para um δ -pulso de 3s para uma solução de 10%(4g/l) BSA-água pelo método de Taylor. Atraso do pulso de 52s.	95
4.1	Fórmulas estruturais de biotina e biotina sulfonada (sulfo-NHS-biotina). Adaptada da Ref. [115].	100

4.2	Evolução da mudança de cobertura em função do tempo para diferentes concentrações de biotina, variando entre 0,082 e 2,05 mM.	104
4.3	Possíveis representações de um complexo bimolecular estável de biotina em ouro, mantidos juntos por meio de (a) ligação de hidrogênio dupla formada pelos grupos carboxílicos e duas moléculas, (b) uma ligação simples de hidrogênio formada entre o grupo carboxílico de uma molécula e o anel de ureido (tetrahydroimidizalone) de outra molécula. Figura adaptada de [121]	105
4.4	Diagrama com a variação da cobertura superficial de equilíbrio versus concentração de biotina. A inserção representa o inverso da cobertura de superfície ($1/\theta$) em função do inverso da concentração de biotina (C).	106
4.5	Possível arranjo molecular da adsorção de biotina no ouro a partir de uma configuração multicamadas para uma formação em monocamada, após lavagem PBS. Figura adaptada de [121]	107
4.6	Evolução da mudança do índice de refração em função do tempo quando da admissão da biotina seguida da admissão de neutravidina (NA). Na janela é mostrado o efeito do pré-tratamento na superfície de ouro sobre a ligação de NA, revelando um padrão de adsorção oscilante invulgar da proteína.	108
4.7	Evolução da alteração do índice de refração em função do tempo após a admissão de biotina seguida por admissão de Soro Humano (HS).	109
4.8	Gráfico com a curva da evolução da adsorção da biotina, a curva derivada da cobertura e aproximação dessa curva por uma exponencial, para uma concentração alta de biotina.	111
4.9	Curvas da evolução da adsorção da biotina, da derivada da cobertura e aproximação por uma exponencial, para uma concentração média de biotina.	112
4.10	Curvas da adsorção da biotina, da derivada da cobertura e aproximação por uma exponencial para uma concentração baixa de biotina.	113
4.11	Ilustração das características de adsorção e desorção de imobilização de filmes de proteínas: Caso A - existência apenas de ligações irreversíveis. Caso B - remoção das fração reversível. Caso C - ausência de ligações.	115

4.12	Transientes de adsorção de proteína imediatamente após admissão da Neutravidina à superfície de ouro hidrofílica, previamente limpa, e após 5 min de exposição da superfície (pré-limpa) à atmosfera ambiente.	117
4.13	Diagrama das características de adsorção e desorção de avidina na superfície de ouro em função do tempo para diferentes concentrações.	118
4.14	Diagrama da cobertura de avidina na superfície de ouro em função da concentração.	119
4.15	Diagrama de adsorção e desorção da Neutravidina na superfície de ouro em função do tempo para diferentes concentrações.	120
4.16	Diagrama da cobertura de neutravidina na superfície de ouro.	121
4.17	Diagrama das características de adsorção e desorção de BSA na superfície de ouro em função do tempo para diferentes concentrações.	122
4.18	Diagrama das características de adsorção e desorção de BSA na superfície de ouro.	123
4.19	Diagrama das características de adsorção e desorção de soro humano na superfície de ouro em função do tempo para diferentes concentrações.	124
4.20	Diagrama das características de adsorção e desorção de soro humano na superfície de ouro.	125
4.21	Diagrama do Imunossensor com o analito na célula de fluxo. No realce a camada de detecção com anticorpos imobilizados onde serão ligados os antígeno DENV que estiverem presentes.	130
4.22	Funcionalização ideal para um imunensaio onde: 1) Substrato de vidro ou polímero coberto com uma fina camada de ouro (G) de 50 nm. 2) Camada (auto-organizada) monomolecular de Biotina sulfonada (BS). 3) Camada monomolecular de Neutravidina (NA), de $\sim 5nm$ de espessura. 4) Camada Monomolecular de Anticorpos, conjugados com Biotina (ABBi) 5) Vírus DENV, tamanho de aproximadamente 50 nm.	132

4.23	Condições reais de um imunoenensaio onde: 1)Substrato de vidro ou polímero com a camada de ouro (G) de 50 nm 2)Filme de Biotina (B) com enxofre (sulfur-S) 3)Filme de Neutravidina (NA) - 5 nm 4)Anticorpos combinados com Biotina (AB_{Bi}) 5)Vírus dengue especificamente ligados aos anticorpos AB_{Bi} 6)Ligações não específicas desconhecidas constituintes do soro (humano).	134
4.24	Condições do imunoenensaio com a (última) camada de reforço 7: 1) Substrato de vidro ou polímero com a camada de ouro (G) de 50 nm. 2) Filme de Biotin (B) com enxofre (sulfur-S). 3) Filme de Neutravidin (NA) - 5 nm. 4) Anticorpos combinados com Biotin (ABBi). 5) Virus dengue especificamente ligados aos anticorpos ABBi. 6) Ligações não específicas desconhecidas. 7) Readmissão de anticorpos específicos com, ou sem, marcadores fluorescentes.	135
4.25	Inserção do <i>chip</i> sensor.	136
4.26	Fixação da camada de imobilização Neutravidina-Biotina.	139
4.27	Imobilização dos MAB_{Bi} 's, anticorpos Biotinilados.	140
4.28	Ensaio1 - com amostra-1 serum "puro" (Manaus).	141
4.29	Ensaio 2. Resultado do teste com amostra-2 positiva para o DENV-2.	142
4.30	68 Ensaio3 com amostra-3 positiva para DENV-2.	143
4.31	Imagens AFM da superfície de detecção a) Indicação da presença de vírus b) Parte da imagem Figura 4.31a ampliada.	144

Capítulo 1

Introdução

Neste capítulo serão apresentados motivação e justificativa para o desenvolvimento deste trabalho, objetivos gerais e específicos e princípios teóricos que o fundamentam.

1.1 Justificativa

A microfluídica é um campo emergente com importantes aplicações em áreas como a biotecnologia, síntese química e química analítica. A microfluídica pode ser definida como a ciência dos sistemas nos quais o comportamento dos fluidos difere da teoria tradicional (domínio macroscópico) devido às pequenas dimensões destes sistemas, e trata da manipulação, transporte e análise de fluidos em microcanais [1]. Sistemas microfluídicos apresentam uma série de vantagens significativas do ponto de vista econômico e tecnológico. Primeiramente, porque transportam pequenos volumes de líquido (desde micro, nano, pico até femtolitros). Essa redução de volume é especialmente significativa para reagentes de difícil aquisição ou em situações onde a quantidade de amostras é crítica. Em segundo lugar, existe uma ampla variedade de aplicações desses sistemas, que vão desde as indústrias de produção de fármacos e na biomedicina, como sistemas de detecção e de diagnóstico, até aplicações industriais de análises químicas rápidas e de alto desempenho [2]. Dispositivos microfluídicos podem ser utilizados para efetuar uma ampla variedade de análises qualitativas e quantitativas, como por exemplo: monitoramento de cinética de reações, interações biomoleculares, eletroforese capilar, imunoenaios, citometria de fluxos, injeção de proteínas para análise (proteômica), análise de DNA, manipulação de células, e muitas outras aplicações em dife-

rentes áreas. Ainda mais, os avanços tecnológicos na fabricação de dispositivos tornaram possível a construção de dispositivos miniaturizados com complexas redes de canais, válvulas, bombas e outros métodos de encapsulamento fluídico e de manipulação. Atualmente, as técnicas de fabricação de dispositivos microfluídicos têm conseguido redução de custos, permitindo a produção em larga escala, bem como a integração de múltiplas etapas em um único dispositivo. Em consequência do tamanho reduzido do sistema fluídico, é possível completar uma análise em um intervalo de tempo na ordem de segundos.

Uma característica importante no projeto desses dispositivos está na contínua busca de novos efeitos, melhor desempenho e dimensionalidade. Um grande mercado previsto para microfluídica é a criação de dispositivos portáteis e integrados para o monitoramento ambiental, detecção de armas químicas como também para diagnósticos clínicos para uso laboratorial e no futuro próximo para uso doméstico, reduzindo o tempo de análise e custo por paciente [3].

Muitos sistemas automatizados, tais como imunoanalisadores e de análises bioquímicas, foram desenvolvidos para diagnósticos médicos, para permitir uma coleta de dados mais rápida e eficiente, devido à quantidade de amostras que os hospitais lidam diariamente. No entanto, tais equipamentos automatizados não são adequados para utilização em diagnóstico rápidos nos laboratórios de análise química e para pontos de atendimento descentralizados. E ainda, esses equipamentos exigem pessoal altamente qualificado, não são portáteis e muitas vezes de custo elevado. Deste modo, existe uma necessidade crescente por dispositivos portáteis com características adequadas de precisão e rapidez, como ferramentas inovadoras para efetuarem diagnósticos médicos mais próximos do paciente. Não há dúvida de que o recente progresso da tecnologia microfluídica irá contribuir fortemente para o desenvolvimento de dispositivos analíticos miniaturizados que possam ser usados como microlaboratórios de análise clínica [4]. Assim, em um futuro próximo, o monitoramento da saúde da população poderá ser viabilizado através de dispositivos compactos, de baixo custo e de fácil manuseio, realizando medições de vários parâmetros indicadores do estado de saúde de uma pessoa, a partir de amostras de fluidos corporais, como sangue, soro, suor, saliva e urina [5].

Deve-se observar que o microespaço líquido tem características que diferem das propriedades em macroescala: um alto valor na razão entre superfície e volume, pequena capacidade de aquecimento e, principalmente, a difusão em curtas distâncias. Uma molécula leva apenas dezenas de segundos para percorrer $100\mu m$ [6]. Uma outra característica importante de fluidos em microca-

nais é ter fluxo laminar. Essas e outras características reunidas constituem uma propriedade única - a microfluidez, que permite analisar amostras complexas, como as do sangue humano, ou de meios ambientes contaminados. Há também necessidade de maior discussão sobre os efeitos do escalonamento na microfluídica. A velocidade e a relação entre as dimensões de altura e comprimento versus área do sensor são importantes e influenciam no comportamento do fluxo, em processos de misturas, reações, separações e manipulação de partículas em microescalas. Dimensões geométricas reduzidas dos microcanais, causam padrões de fluxo mais complexos, particularmente nas proximidades das paredes onde ocorre maior influência dos efeitos de superfície. Esses podem ter origem na rugosidade e atrito da microsuperfície, em microbolhas de ar ou na formação de camadas limite, campos elétricos locais por cargas adsorvidas e impurezas e gradientes potenciais interfaciais. Uma questão importante, mas raramente considerada, diz respeito às propriedades de atração da água pelas superfícies, ou seja, se essas se comportam como hidrofílicas ou hidrofóbicas e, ainda, à influência de forças capilares [7]. Os dispositivos, propriamente ditos, têm dimensões que variam entre alguns milímetros até micrometros. Pelo menos uma das dimensões dos dispositivos é frequentemente medida em micrometros, como por exemplo, um microcanal em um dispositivo. Porém a miniaturização do sistema por inteiro, embora possa ser vantajosa, não é um requisito para um sistema microfluídico. A quantidade microscópica de fluido é que é importante nesse sistema [8]. Esses dispositivos microfluídicos requerem construção e projeto adequados que diferem dos componentes em macroescala. Leis de escalonamento comparam a performance relativa de um sistema quando as suas dimensões mudam. No entanto, em geral, não é possível aplicar essas leis, baseadas em modelos contínuos clássicos, a dispositivos convencionais, quando as suas dimensões são reduzidas para microescala. As quantidades físicas dominantes mudam, como consequência da mudança de escala da estrutura atômica, e dos efeitos da trajetória-livre-média e mecânica quântica [8] e [9]. Principalmente, foi observado que, sob determinadas condições, condutos microfluídicos e macrofluídicos revelam propriedades hidrodinâmicas substancialmente diferentes, que ainda não são bem conhecidas e explicadas. Por exemplo, em escalas muito pequenas, a condição de não escorregamento (*no-slip*) na parede do canal, comumente se aplica de forma modificada, mas é tratada de modo insuficiente pela teoria convencional [10].

Em sistemas microfluídicos, conhecimento sobre o transporte biomolecular é necessário para se selecionar adequadamente as forças de controle que direcionam o movimento. Mais ainda, a

determinação e análise de parâmetros de transporte, com precisão e confiabilidade, é importante e necessária para a otimização de parâmetros de desempenho e aperfeiçoamento dos microdispositivos e das células de fluxo [9]. Para várias aplicações especiais esse estudo de sistemas microfluídicos é essencial como, por exemplo, na determinação do DNA, onde pode permitir a redução do volume de fluido, crítico para essa aplicação. Há também uma demanda urgente por avanços no desenvolvimento de novos métodos para análise de proteínas com alta eficiência, sensibilidade e flexibilidade nas análises.

Contudo, têm sido poucas e limitadas as investigações e experimentos nessa área. Por outro lado, na última década, houve um avanço significativo no desenvolvimento de biossensores com métodos ópticos de detecção. A combinação de elementos ópticos em sistemas microfluídicos, a chamada optofluídica, está ajudando no desenvolvimento de novos dispositivos de modo a aumentar a portabilidade e sensibilidade. Dentre esses, se destacam os que se utilizam da tecnologia de ressonância de plasmon de superfície (SPR). A técnica SPR pode ser empregada para estudos de fenômenos de superfície, monitorando a medida da mudança do índice de refração devida, por exemplo, à ligação de uma camada orgânica à superfície de um metal [11]. A faixa óptica sensível do fenômeno de SPR consiste num intervalo de distância da parede, precisamente definido, no qual parâmetros de fluxo são extraídos. O sensor SPR apresenta algumas vantagens em relação a outros sensores ópticos, como métodos cromatográficos e microscopia de epifluorescência, devido à sua alta sensibilidade, precisão e rapidez. Contudo, a maior vantagem dos sensores SPR são a sua versatilidade e facilidade de utilização. SPR é eficaz no estudo de interações para uma grande variedade de pesos moleculares de analitos [12]. Ainda mais, dispositivos SPR portáteis, de baixo custo e com boa precisão podem ser desenvolvidos com um sistema microfluídico. As vantagens dos sensores SPR, aliadas aos sistemas microfluídicos, abrem uma nova perspectiva de aplicações na saúde, em sistemas de diagnósticos médicos, como também em outras áreas como controle ambiental, qualidade da água e em conservação de alimentos. Isto pode ser implementado pelo acoplamento do sensor SPR a uma das paredes do canal microfluídico, onde é instalada a superfície de detecção do sensor. Essa proposta de dispositivo alia as propriedades de um sistema de fluxo miniaturizado, com as vantagens de um sensor SPR, que é bem adequado para o monitoramento de mudanças moleculares na superfície sensível, que deve ser previamente preparada de acordo com a aplicação [12]. Com esse sistema microfluídico SPR, é possível se avaliar quantitativamente os parâmetros de transporte próximos à superfície de detecção do sensor, sem

adsorção, com uma alta resolução espacial, através de experimentos, como indicação de desempenho do sistema. E ainda, pode-se analisar a influência desses parâmetros nas constantes cinéticas das reações. Avaliações qualitativas de afinidades em interações moleculares também podem ser realizadas, assim como análises quantitativas, estudos de especificidades, análise e comparação de modelos de ligação de diferentes espécies e outras aplicações [13], quando há adsorção na superfície de detecção do sensor.

Há uma demanda e um mercado potencial em todo o mundo, para dispositivos portáteis, que podem ser usados para diagnósticos e outras aplicações. Esses sistemas implementados com a tecnologia de sensores SPR têm a vantagem de serem produzidos com menor custo com maior rapidez de resposta. Dispositivos microfluídicos SPR podem ser potencialmente usados de preferência para a detecção de biomarcadores (e.g.: CRP para cardíacos; PSA para câncer de próstata; marcador de metástase) possibilitando o diagnóstico precoce e o controle de várias doenças, bem como para a seleção de amostras em bancos de sangue. Em especial, em países tropicais e subtropicais, onde se situa o Brasil, há necessidade de detecção precoce e de um controle epidemiológico mais eficaz de doenças, como a causada pelos vírus dengue, onde há uma maior ocorrência [14], [5] e [15]. Isso pode ser implementado utilizando-se um dispositivo portátil, de baixo custo e de fácil manuseio, distribuído em hospitais e postos de saúde. É importante o desenvolvimento de um sistema que possa detectar e identificar os 4 sorotipos de vírus dengue [16]. Primeiramente para que se tenha um diagnóstico precoce da doença e um controle epidemiológico mais eficiente. Mais importante ainda é se identificar o sorotipo, ou seja, dentre os tipos já conhecidos do vírus. Isto porque uma segunda infecção por um tipo de vírus diferente da primeira é a causa mais provável de casos mais graves da doença, como dengue hemorrágica [17], [15]. Recentemente cientistas descobriram um novo tipo do vírus dengue na Ásia, o tipo DENV5, diferente dos quatro sorotipos anteriormente conhecidos da dengue, o que foi confirmado por sequenciamento genético. A descoberta pode tornar ainda mais difícil o desenvolvimento de uma vacina contra a doença. O anúncio foi feito pelo virologista Nikos Vasilakis, da Universidade Texas Medical Branch, nos Estados Unidos [18].

O estudo desenvolvido neste trabalho deve ser realizado explorando o potencial do sistema microfluídico SPR, através do desenvolvimento de métodos experimentais. Propõe-se efetuar a avaliação de parâmetros na cinética das ligações de substâncias na superfície do sensor, importantes para imunoenaios e em diagnósticos médicos, e a influência dos transportes de massa,

convectivo e difusivo, nestes parâmetros. Enfim, é de suma importância realizar um estudo que contribua para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos nos quais são integrados sensores SPR, aliando-se as vantagens dos dois sistemas, visando atender à demanda por instrumentos portáteis, precisos e de baixo custo, que podem ser utilizados para melhorar o atendimento e a qualidade da saúde e controle do meio ambiente. Com este trabalho se almeja contribuir para o desenvolvimento, no futuro próximo, de um sistema de diagnóstico e método de detecção de afinidades (como em reações antígeno-anticorpo) com ênfase na detecção do vírus dengue, como uma ferramenta de fácil manipulação, rápido diagnóstico e de relativo baixo custo visando a sua utilização em laboratórios clínicos, hospitais e em instituições médicas de pequeno porte, como postos de saúde, que possa ser operado por técnicos não especializados. Com esse método visa-se atender à necessidade de um diagnóstico precoce, rápido e preciso da dengue para um tratamento médico adequado e imediato e ainda à identificação do tipo de vírus, viabilizando um controle epidemiológico efetivo.

1.2 Objetivos

O objetivo com este trabalho é estudar sistemas microfluídicos através de métodos experimentais visando à otimização de parâmetros de desempenho (como sensibilidade, estabilidade, especificidade e reprodutibilidade), e efetuar análise de mecanismos de adsorção e de interações moleculares de substâncias na superfície de ouro do sensor. Numa primeira abordagem, sem adsorção de substâncias na superfície de detecção, pretende-se avaliar os parâmetros de transporte próximos à superfície, com uma alta resolução espacial, através de experimentos. Em seguida propõe-se efetuar análise de mecanismos de adsorção de substâncias para a detecção de afinidades (antígeno-anticorpo). Essa análise visa à preparação do dispositivo microfluídico SPR como imunossensor, com ênfase na detecção do vírus dengue.

Com esse estudo, pretende-se alcançar os seguintes objetivos específicos:

1. Desenvolver um método experimental para avaliação quantitativa da velocidade de escoamento (*slip-flow*) nas paredes do canal microfluídico, quando não há adsorção de substâncias na superfície de detecção do sensor.
2. Desenvolver um método experimental para determinação do coeficiente de difusão de subs-

tâncias sem adsorção na superfície de detecção.

3. Efetuar avaliação qualitativa e quantitativa das constantes cinéticas e da termodinâmica na adsorção de substâncias como biotina, avidina, neutravidina e albumina sérica bovina (BSA) com a superfície de ouro. Como exemplo de aplicação do estudo de adsorção realizar imunoenaios.
4. Estudar os efeitos da variação da concentração e dos parâmetros de transporte convectivo-difusivo na cinética das reações, como indicadores de parâmetros de desempenho do sistema microfluídico SPR.

1.3 Revisão bibliográfica

São apresentadas aqui revisões de contribuições na área de microfluidos, da tecnologia SPR e de adsorção e interações moleculares e ainda, métodos de detecção do vírus dengue.

1.3.1 Sistemas microfluídicos

Transporte de partículas em fluidos, que contêm solutos diluídos, é tratado adequadamente através da combinação da equação de fluxo convectivo difusivo (ECD) com a equação hidrodinâmica de Navier-Stokes (ENS), trabalho amplamente fundamentado em [19]. Estas equações relacionam a pressão local e as velocidades dentro de um corpo do fluido, em movimento, e representam os princípios de conservação da massa, momento e energia. No canal microfluídico o fluxo de massa total é dado pela soma de ambos os fluxos -difusivo e convectivo. As equações ECD e ENS representam equações parciais de segunda ordem, não lineares, com coeficientes variáveis. As soluções dessas equações devem prover, tanto o desenvolvimento temporal, como a distribuição espacial da concentração do soluto e o seu perfil de velocidade. Encontrar a solução dessas equações, ECD e ENS, é de grande complexidade matemática devido às dificuldades nas definições das condições iniciais e de contorno que dependem criticamente da natureza dos processos físicos e bioquímicos dos solutos nas soluções, e da interação em, ou sobre, as superfícies de interfaces bioativas, que atuam como elementos sensíveis ou funcionalizados.

As dificuldades matemáticas para encontrar soluções analíticas fechadas sugerem o uso de

cálculo numérico, com elementos finitos, ou implementação de aproximações simplificadas. Um exemplo é uma abordagem anterior para quantificar transporte de soluto em um canal de fluxo microfluídico, que adota conceitos analíticos e aproximações, inicialmente desenvolvida para uma célula eletroquímica de camada fina [20]. Anteriormente, transporte difusivo-convectivo de íons em canais retangulares foi tratado matematicamente em detalhes em [21], embora restrito a condições estacionárias. Uma solução da ECD, usando series, para um eletrodo de disco rotativo no domínio do tempo, empregando a representação no domínio de Laplace, foi divulgada [22]. Da mesma forma uma abordagem computacional da dinâmica dos fluidos para tratar transporte de massa e a cinética da adsorção macromolecular, sob condições não estacionárias, foi desenvolvida [23]. Cálculos de elementos finitos de sistemas de microfluxo, são agora implementados, porém, frequentemente, não são acompanhados de verificação experimental. Perfis de velocidade em microcanais, gravados através de velocimetria por imagens de partículas (PIV), revelam desvios significativos do comportamento ideal do fluxo, particularmente em fronteiras de fluxo e interfaces, e nas vizinhanças das paredes do canal [10]. À distâncias menores que $5 \mu m$, os efeitos de camadas limite, oscilações de fluxo, assim como movimentos de fluido tipo vórtice, foram avaliados, enquanto que para maiores distâncias o perfil parabólico foi amplamente mantido [24] e [25]. A técnica PIV, contudo, não é adequada para se testar confiavelmente a região na vizinhança da superfície, à distâncias (ou abaixo) da faixa de μm . Dados quantitativos são importantes, uma vez que estes determinam as características de desempenho, e eficiência de adsorção, da célula de fluxo.

No sistema utilizado neste trabalho, o instrumento óptico, sensor SPR, é parte integrante do canal microfluídico. A resposta transitória, obtida dos dados de ressonância de plasmon de superfície (SPR), na ausência de adsorção pela superfície, pode ser usada para extrair dados quantitativos de transporte do soluto. A função física relacionada e as condições de operação do sensor de ressonância de plasmon de superfície, e a descrição do instrumento, que se pretende usar nesse trabalho, estão detalhadas nos itens a seguir e em [26]. Uma reavaliação do transporte de massa e de reações de superfície em sistemas microfluídicos, relevantes para os experimentos de ressonância de plasmon de superfície, foram publicados [27], [28] e [29]. Ambas as velocidades, convectiva e difusiva, se superpõem e diferem entre si, substancialmente. Esta diferença pode ser explicada e elaborada baseando-se na, já anteriormente citada, equação de difusão convectiva, que se aplica ao sistema de fluxo, sob investigação. Com relação à velocidade difusiva, existem várias técnicas

experimentais analíticas que podem ser usadas para medir coeficientes de difusão de substâncias, em líquidos. A análise de dispersão de Taylor [30], [31] tem sido bastante utilizada como base para exploração experimental, na medição de coeficientes de difusão. Outros métodos alternativos como traçador radioativo, gradiente de pulso de ressonância magnética nuclear (NMR) [32], métodos cromatográficos [33], fracionamento de fluxo de campo (FFF) [34] e espalhamento de luz [35] têm sido publicados para medição de parâmetros de transporte e de interações de substâncias em solução. Estas técnicas, porém, são complexas ou inconvenientes para uso frequente. Recentemente, um sensor-T, microfluídico, em conjunto com microscopia de epifluorescência, como um método óptico de detecção de partículas, foi utilizado para determinar coeficientes de difusão de moléculas pequenas e grandes [3]. Esse método quantitativo apresentou alta precisão, combinada com um curto tempo de medição. Dados quantitativos foram obtidos por estimativa utilizando-se um modelo unidimensional, com o comprimento de difusão dado por $2(D\Delta\tau)^n$, onde D é o coeficiente de difusão, $\Delta\tau$ é a variação do tempo e o fator de escala $n=0,5$. Contudo, um trabalho de pesquisa recente [36] indica que existem desvios da aproximação ideal unidimensional (1-dim) de Einstein em configurações microfluídicas, onde a relação de escalonamento, n , varia entre 0,3 a 0,67 ao longo da extensão do microcanal. Investigações experimentais das relações de escalonamento têm sido publicadas [37], onde são usadas microscopia de fluorescência confocal. Nestas, tem sido analisada difusão transversal de solutos de baixo peso molecular, em fluxo laminar de duas fases, através da interface entre duas soluções, em microcanais com número de Péclet alto, onde variações como $0,33 < n < 0,5$ têm sido observadas.

1.3.2 Tecnologia SPR

O fenômeno de Ressonância de Plasma de Superfície foi observado em 1900 [38] e [39] como um líquido de alta densidade, ou plasmon, que pode ser excitado por ondas eletromagnéticas aplicadas para gerar oscilações do plasmon. Desde então, as suas propriedades fundamentais foram extensivamente estudadas no vácuo por espectroscopia de perda de elétrons. As ondas de plasmon de superfície (SPWs) foram demonstradas em 1950 por meio de experiências com elétrons passando através de folhas de metal, mostrando a existência dessas ondas de superfície eletromagnéticas sobre a interface metal/dielétrico [40], [41]. Ritchie atribuiu as características observadas nas perdas de energia dos elétrons à excitação das ondas de plasmon de superfície [42]. A excita-

ção das SPWs pela luz foi introduzido por Otto [43]. As ondas foram excitadas por meio de uma configuração de Reflexão Total Atenuada [44]. A excitação ressonante de SPWs é chamada de ressonância de plasmon de superfície (SPR). Um trabalho de Kretschmann [45] desenvolveu uma aplicação prática e o uso comercial de SPR. No mesmo ano, ele descobriu que as SPWs também poderiam ser excitadas em cima de uma película de prata depositada sobre um substrato de vidro, por uma luz sendo totalmente refletida pela parte de trás do filme de prata, ou seja, sendo refletida pela interface vidro/prata. Por conseguinte a configuração de Kretschmann permitiu a separação dos elementos necessários para excitação e a detecção, espacialmente, a partir da região de sensoriamento. Em um trabalho pioneiro, Nylander e Liedberg et al. [39] demonstraram que a SPR na configuração de Kretschmann foi bem adaptada para ambos os fins, de detecção de gás e biomolecular. Eles descreveram o uso de ressonância de plasmon de superfície para monitorar reações de afinidades em tempo real, como dispositivos imunossensores. Desde então, os imunossensores SPR tiveram grande aplicação no estudo de interações receptor-alvo. O dispositivo BIAcore, lançado em 1990, é baseado nessa tecnologia [46], [47]. Seu sucesso pode ser atribuído à sua capacidade para detectar interações biomoleculares em tempo real, sem a necessidade de qualquer marcador. Contudo, esse e outros instrumentos disponíveis comercialmente são de grande porte e caros e, portanto, não são adequados para serem usados em aplicações que requerem instrumentos portáteis. Mais recentemente, avanços na tecnologia SPR tornou possível o desenvolvimento de instrumentos mais compactos [48]. No trabalho [49] os autores propuseram um sistema portátil semi-automático, SPIRIT, baseado no sensor Spreeta 2000 fabricado pela Texas Instruments para monitoramento em tempo real de múltiplos analitos que variam de pequenas moléculas a grandes micróbios.

Publicações acadêmicas contêm descrições de uma ampla variedade de dispositivos que utilizam enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticorpos e células intactas, em combinação com eletroquímica, transdutores ópticos, piezoelétricos e térmicos, [50], [51], [52], [53], [54], e [55]. Vários métodos e técnicas de diagnóstico são baseados nos procedimentos de imunoenaios. Entre eles, o ensaio imunoenzimático - Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ou simplesmente ELISA, é o método tradicional de diagnóstico [56]. Contudo, algumas restrições são associadas ao ELISA: o tempo para o surgimento dos anticorpos no paciente é em torno de 5 dias, desde os primeiros sintomas; requer múltiplas etapas de lavagem e incubação; a superfície do poliestireno não é homogênea e as proteínas podem ter ligações diferentes em poços da mesma placa; a presença

de materiais contaminantes na amostra pode levar a erros no sistema de detecção; a necessidade de se ter um equipamento (espectrômetro, fluorímetro, entre outros) para quantificar o patógeno detectado limita sua utilização para aplicações portáteis e em tempo real, além de ter um custo relativamente alto; os marcadores modificam a medida precisa das constantes cinéticas, como o equilíbrio químico e interferem nas ligações ou outras interações moleculares e, inclusive, podem ser tóxicas para as células (células tronco ou primárias, por exemplo), além de promover reações cruzadas de anticorpos; para medidas repetitivas, como as necessárias para a detecção de certos patógenos, os poços podem ser contaminados ou, mesmo as substâncias em análise, podem sofrer alterações. Anteriormente foram publicados muitos trabalhos sobre imunoenaios como em [57] que estuda a imun química da ligação de anticorpos com antígenos imobilizados numa superfície sólida onde resultados experimentais com ELISA foram comparados com análises de diferentes modelos teóricos de mecanismos de reações em interfaces sólido-líquidas. Porém, devido à complexidade que envolve os imunoenaios experimentais e os altos custos envolvidos, análise de reações antígeno-anticorpo foram desenvolvidas utilizando muito mais modelos computacionais por simulação numérica do que ensaios experimentais [58]. Um exemplo é o trabalho [59] de modelagem de cinética de reação antígeno-anticorpo em um *biochip* microfluídico, por simulação numérica. Neste, um modelo computacional foi desenvolvido para representar o transporte de massa (convectivo e difusivo) e a reação de ligação entre um antígeno (analito), e o anticorpo imobilizado na superfície do canal. A influência da velocidade do fluxo, concentrações do antígeno e do anticorpo, além da geometria do *microchip* na cinética das reações, foi analisada. Contudo, os resultados apontam para a necessidade de experimentos práticos para conclusões mais precisas das análises. Materiais orgânicos, enzimas, proteínas, células inteiras ou outros materiais biológicos, imobilizados em substratos sólidos, são componentes essenciais para o projeto e funcionamento de dispositivos utilizados em ensaios. A presença, e a detecção de afinidades específicas entre receptores/ligantes e analitos podem ser favoravelmente usadas para a identificação de analitos assim como para diagnósticos clínicos. Contudo, também em métodos analíticos, a adsorção de proteína não específica na superfície dos sensores, *chips* de proteínas ou plataforma de ensaios pode reduzir a sensibilidade e seletividade (especificidade) do dispositivo. Observou-se que em métodos de identificação que usam proteínas conjugadas a outras substâncias a especificidade é aumentada. E, apesar dos grandes esforços nessa área, questões importantes sobre mecanismos complexos de interações moleculares de proteínas ainda precisam ser investigadas e discutidas.

1.3.3 Adsorção e interações moleculares

Uma etapa importante na preparação de um imunoenensaio é a imobilização de substâncias na superfície do sensor. A imobilização de material biológico e bioquímico formando camadas, filmes finos, em interfaces sólido-líquido é um mecanismo complexo e presente em muitos processos físicos, químicos e biológicos. Há um interesse crescente na pesquisa dos mecanismos de adsorção e interações moleculares em várias áreas, entre as quais o entendimento do metabolismo de células, fabricação e análise de drogas, biocompatibilidade relativa aos métodos de implantes e transplantes médicos, mecanismos imunológicos, desenvolvimento de biossensores, assim como na tecnologia de processos industriais e farmacêuticos. Nos processos biológicos, por exemplo, a adsorção de proteínas faz parte do mecanismo de coagulação do sangue e na construção de tecidos artificiais. Esse fenômeno ocorre também onde não é desejado, como em implantes biomédicos que, quando em contato com fluxo sanguíneo, a adsorção de proteínas pode causar trombose. Ao contrário de moléculas pequenas que se comportam como partículas rígidas, a maior parte das proteínas não são adsorvidas, ou dessorvidas, nas superfícies, de forma simples, com uma determinada probabilidade. Ao contrário, a complexidade da composição e estrutura das proteínas causam reações bem mais diversas como rearranjo estrutural, mudanças de afinidades com a superfície durante a adsorção, efeitos cooperativos de adsorção, efeitos de exclusão por tamanho ou agregação na superfície, causados por forças de interações eletrostáticas/eletroquímicas, Van-der Waals e covalente/químicas. Ainda, ligações de proteínas podem ser função do tipo de solvente, substrato, condições de superfície (se hidrofílicas ou hidrofóbicas), pH da solução tampão, força iônica, tipo de proteína e concentração, temperatura e potenciais eletrostáticos inerentes ou aplicados [60], [61], [33] e [62]. Os fundamentos dos mecanismos de ligações moleculares irreversíveis de proteínas a substratos sólidos, ainda permanecem desconhecidos. Diferenças estruturais bem pequenas podem causar comportamentos de ligações muito diferentes [63] e [64].

1.3.4 Técnicas para detecção do vírus dengue

A infecção pelo vírus dengue (DENV) é diagnosticada rotineiramente por meio de testes de presença de anticorpos IgG e IgM (ELISA) em laboratórios, mas os resultados só podem ser confirmados após 5 dias, ou mais, após o início dos primeiros sintomas da infecção, quando os anticorpos já estão presentes em quantidade suficiente para serem detectados com segurança e, con-

sequestramente, estados mais graves da doença, muitas vezes, não podem mais ser evitados [65], [66]. As técnicas mais modernas de detecção da presença do DENV são RT-PCR e isolamento viral [11]. Porém estas requerem uma estrutura laboratorial e pessoal especializado, além do que a técnica por detecção de RNA viral (RT-PCR) é sensível à contaminação. Uma técnica mais recente tem sido aplicada em laboratórios para diagnóstico rápido do vírus dengue, ensaio Platelia Dengue NS1 Ag, desenvolvida por Bio-Rad em parceria com o Instituto Pasteur, na França, é um teste ELISA e permite a detecção do antígeno NS1 do vírus dengue, logo que os primeiros sinais clínicos aparecem [67]. Porém essa técnica não é bastante sensível, não identifica o tipo de vírus, e é usada como um teste inicial de seleção e rastreamento, ou seja, deve ser combinado com outros testes, como reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) ou detecção de anticorpos IgG e IgM (ELISA), para a confirmação do diagnóstico de infecção por dengue [68]. Poucos trabalhos de pesquisa foram publicados utilizando biossensores para detecção de anticorpos através da imobilização de antígenos DENV [52], [69], [70], [71], [72], [73]. Mais recentemente, um trabalho utilizando nanotubos de carbono, através de detecção eletroquímica, foi publicado para detecção da proteína NS1 do vírus dengue [52]. Com esse método, porém, não se pode identificar o tipo de vírus, embora este método apresente maior sensibilidade. Não se tem conhecimento, até aqui, de publicações de trabalhos com imunossensores SPR para a detecção dos vírus dengue, em soro humano. Até agora apenas um trabalho utilizando o sensor SPR foi publicado para detecção de anticorpos IgG anti-dengue através da imobilização de antígeno do DENV [11]. Contudo, para esse trabalho não foram realizados ensaios com amostras de soro de pacientes, e, portanto, não estavam presentes as fontes de interferências por ligações não específicas.

As principais limitações das técnicas conhecidas são: 1) contaminação; 2) tempo de resposta - os resultados dos testes sorológicos e de isolamento viral só podem ser confirmados após cinco ou mais dias; 3) alto custo 4) NS1 ELISA - devido à baixa sensibilidade, é usado como um teste inicial em laboratórios e não identifica o tipo de vírus dengue.

Apesar do fato de alguns avanços tecnológicos terem cumprido as necessidades de aplicação, as técnicas disponíveis não atendem aos requisitos básicos para o sucesso de diagnósticos: simplicidade, economia, rapidez e precisão. Enfim, pode-se afirmar que, apesar da ampla morbidade e mortalidade, ainda não estão disponíveis meios nos laboratórios clínicos e postos de saúde, para a detecção e identificação precoce dos vários tipos de DENV.

1.4 Organização do trabalho

A apresentação deste trabalho está organizada da seguinte forma: No Capítulo 1 - Introdução se discute a motivação e importância do estudo de sistemas microfluídicos e de aplicações desses sistemas como imunossensores aliados às vantagens da tecnologia SPR, e revisão bibliográfica de como esse estudo tem sido tratado até então. No Capítulo 2 são apresentados os fundamentos teóricos da microfluidodinâmica, descrição de biossensores, tecnologia SPR, tópicos sobre adsorção e interações moleculares, imunossaios e imunobiossensores SPR. No Capítulo 3 são apresentados os métodos experimentais desenvolvidos, sem adsorção na superfície de detecção do sensor SPR, para determinação quantitativa de parâmetros de transporte (fluxo de escorregamento e coeficiente de difusão), no sistema microfluídico. É feita a comparação com um modelo de fluxo convectivo-difusivo em simulação por computação numérica. No Capítulo 4 é apresentado o método desenvolvido para estudo de mecanismos de adsorção molecular e apresentados alguns resultados da análise cinética na adsorção da biotina, avidina e neutravidina, BSA e soro humano na superfície do sensor. Como um estudo de aplicação com adsorção, é apresentada uma prova de conceito de um método desenvolvido para o sistema microfluídico, usado como imunossensor SPR, com ênfase para detecção e identificação dos tipos de vírus dengue. No último capítulo são discutidos os resultados e apresentadas as conclusões do trabalho e perspectivas para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Fundamentos teóricos

Os aspectos teóricos que fundamentam o estudo dos sistemas microfluídicos, de bio-sensores e da tecnologia SPR, necessários para o desenvolvimento dos métodos experimentais, são apresentados a seguir. São apresentados também os princípios de imunologia e tópicos sobre adsorção e processos de imobilização e mecanismos de interações moleculares que formam a base para o desenvolvimento de imunoenaios.

2.1 Fundamentos teóricos da micro-fluidodinâmica

Entende-se como micro-fluidodinâmica o estudo da teoria dos fenômenos de transporte e da fluidodinâmica aplicada aos microfluidos. Numa célula microfluídica, tipo canal, retangular e com pequenas dimensões, como a utilizada neste trabalho, o analito passa entre duas paredes muito próximas, como indicado na Figura 2.1.

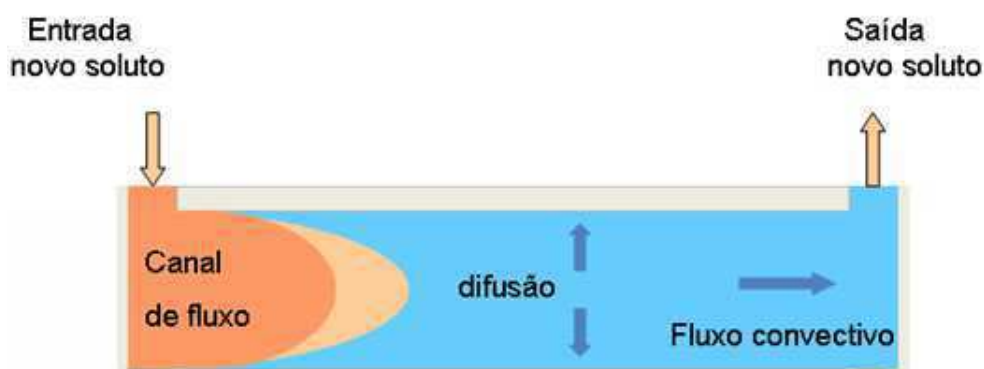


Figura 2.1: Célula microfluídica com canal retangular.

O fluxo no canal decorre da interação de dois diferentes mecanismos de transporte, superpostos e perpendiculares: difusão molecular do soluto a partir da massa do fluido na direção das paredes do canal, impulsionada pelos gradientes de concentração locais; e o transporte hidrodinâmico convectivo do soluto na solução, ao longo do canal, indicados na Figura 2.1.

Transporte de partículas em fluidos, que contêm solutos diluídos, é tratado adequadamente através da combinação da equação de fluxo convectivo difusivo (ECD) com a equação hidrodinâmica de Navier-Stokes (ENS), publicado por Levich [19]. Estas equações relacionam a pressão local e as velocidades dentro de um corpo do fluido em movimento, e representam os princípios de conservação da massa, momento e energia. A equação de Navier-Stokes (2.1) descreve o estado do fluido no canal e representa a conservação do momentum (quantidade de movimento).

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} - \eta \nabla^2 u + \rho(u \cdot \nabla)u + \nabla P = F, \quad (2.1)$$

na qual ρ é a densidade, u o perfil de velocidade, η a viscosidade dinâmica, P a pressão e F é o campo de força de volume, como a força da gravidade, por exemplo. A equação a seguir (2.2) é a equação da continuidade para fluidos incompressíveis:

$$\nabla \cdot u = 0. \quad (2.2)$$

Quando se expressa apenas a conservação de massa no escoamento de um fluido a equação (2.1) pode ser representada da seguinte maneira:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -div(j), \quad (2.3)$$

na qual j é o fluxo de massa e descreve o movimento da partícula, iônica ou macromolecular, do soluto, no fluxo do solvente [19]. A equação diferencial do fluxo convectivo-difusivo, ECD, mostrada a seguir, é obtida a partir da equação de continuidade:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C - u \cdot \nabla C + R, \quad (2.4)$$

na qual: C - representa a distribuição temporal e espacial da concentração do soluto no solvente; D - é o coeficiente de difusão mútuo entre soluto e solução; u - perfil de velocidade espacial e temporal da solução incluído nas equações (2.1), (2.2) e (2.3); R - termo de Reação (sink e

source).

Os termos de reação não são incluídos quando não há adsorção específica:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C - u \cdot \nabla C. \quad (2.5)$$

As contribuições eletro-cinéticas não são consideradas. Sob condições estacionárias, $\frac{\partial c}{\partial t} = 0$, a ECD (2.5) reduz-se a:

$$D\nabla^2 C = u \cdot \nabla C, \quad (2.6)$$

que pode ser resolvida analiticamente para geometrias simples [19]. O monitoramento da evolução temporal (da concentração), até que as condições estacionárias e o equilíbrio químico tenham se estabelecido, se constitui num método experimental de exploração da ECD. Condições iniciais definidas são necessárias para se extrair numericamente a resposta transitória. No limite assintótico, para $u \rightarrow 0$, para um C finito, a ECD (2.5) se transforma na equação de difusão molecular (Equação de Fick):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C. \quad (2.7)$$

A equação ECD pode ser relacionada com a ENS, na ausência de um soluto diluído, $D = 0$, e substituição da concentração do soluto (analito), C , pela densidade ρ . Substituindo-se u por v , e na ausência do termo difusivo, para $C \rightarrow 0$ com um v finito, a equação ECD (2.4) se transforma na primeira equação de Navier-Stokes, para calcular o perfil de velocidade, v :

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} = -grad(\rho v). \quad (2.8)$$

A ENS, para fluidos incompressíveis, é dada por:

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} = \mu \nabla^2 v - \rho v \cdot grad(P), \quad (2.9)$$

na qual P é a pressão do fluido na célula e μ é a viscosidade da solução. Assim, a evolução da resposta de fluxo dinâmica $\partial C / \partial t_{tot}$, nos limites assintóticos, para $v \rightarrow 0$ e $C \rightarrow 0$, pode prover informações sobre as propriedades dos fluxos, difusivo e convectivo, no canal. A equação de

Poiseuille representa uma solução analítica simples da ENS para um canal tubular e retangular com pequenas dimensões, e é dada por:

$$V_t(z) = \left(\frac{1}{2}\mu\right)\left(z^2 - \frac{h^2}{4}\right)\frac{\partial P}{\partial x}, \quad (2.10)$$

na qual V_t é a componente tangencial de velocidade, na direção do fluxo z , $\partial P/\partial x$ é o gradiente de pressão ao longo do comprimento da célula e h é a altura da célula. Pelo modelo de Poiseuille [19], o perfil ideal de velocidade, através da seção transversal do canal, é parabólico e a condição de não-escorregamento se configura, por essa relação, com $V_t(z) = 0$ para $z = h/2$, na parede do canal. O fluxo total de massa, J , do soluto, na área sensível, é dado pelas duas contribuições de fluxo - difusivo e convectivo:

$$J = Cv - D \cdot (\text{grad}C). \quad (2.11)$$

O cálculo do fluxo total, J , requer a resolução da equação ECD para ambos, $C(x, y, z, t)$ e a velocidade $v(x, y, z, t)$. O fluxo de massa não é uma quantidade constante, mas varia com a posição, dentro do canal. De acordo com as referências [20] e [21], o fluxo relativo do analito pode ser estimado, sob certas suposições, pela introdução do conceito de tempo transitório reduzido, $\tau_R = \tau_{CD}/\tau_D$, definido como a razão entre os tempos transitórios, τ_{CD} e τ_D , referentes aos fluxos convectivo e difusivo, do soluto, através da célula, quando se deslocam paralelo e perpendicularmente à superfície sensível, respectivamente. No estado permanente, o fluxo relativo normalizado (ou eficiência de adsorção), pode ser dado, aproximadamente, por:

$$J_{re} = 1.47(\tau_R)^{\frac{2}{3}}. \quad (2.12)$$

Portanto, para se calcular J_{re} , ambos os tempos, τ_{CD} e τ_D , devem ser determinados.

2.2 Hidrodinâmica da difusividade molecular

A difusão molecular em líquidos está presente em processos físicos e químicos que envolvem transferência de massa como em reações químicas, em processos biológicos como o transporte de nutrientes e metabólicos nos seres vivos e em separação de compostos por técnicas cromatográ-

ficas [74], [75]. Em um líquido puro, o movimento de moléculas é aleatório, em consequência de sua energia térmica. Este movimento, chamado Browniano, foi descrito por Einstein, para um sistema unidimensional, através da seguinte relação:

$$z^2 = 2Dt, \quad (2.13)$$

na qual z^2 representa o deslocamento quadrático médio da molécula; D , o coeficiente de difusão desta molécula; e t , o intervalo de tempo associado. Este coeficiente é chamado de coeficiente de autodifusão [37]. No caso de uma mistura binária que apresente um gradiente de concentração, o fluxo de massa de um componente i na direção z , $J_{i,z}$, é descrito pelas equações conhecidas como Leis de Fick para difusão, onde D é chamado de coeficiente de interdifusão ou de difusão mútua [76]. O fluxo é proporcional ao gradiente de concentração (molecular ou molar). Primeira Lei de Fick, considerando um sistema unidimensional:

$$J_{i,z} = -D_i \frac{\partial C}{\partial x}, \quad (2.14)$$

na qual:

J - é o fluxo de difusão com as dimensões [(quantidade de substância) comprimento⁻² tempo⁻¹] [$\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$].

D_i - é o coeficiente de difusão em dimensões [comprimento²tempo⁻¹][m^2s^{-1}].

C - é a concentração em dimensões [(quantidade de substância) comprimento⁻³] [molm^{-3}].

x - é a posição [comprimento][m].

A segunda Lei de Fick descreve como a difusão faz o campo de concentração mudar com o tempo.

Para um sistema unidimensional:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\text{div}(J) = -D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}. \quad (2.15)$$

Para o caso de duas ou mais dimensões, a Eq. (2.7) (já mostrada antes):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C. \quad (2.16)$$

A equação (2.5) de difusão convectiva ECD, já mostrada no item 2.1, a qual descreve o transporte

de massa para fluidos incompressíveis, pode ser expressa como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v \cdot \nabla C = -D \nabla^2 C, \quad (2.17)$$

na qual C é o campo de concentração do soluto variante no tempo, D é o coeficiente de difusão mútuo entre soluto e solução, e v é a velocidade do fluido. Os termos fonte e dreno não estão incluídos, uma vez que não existe adsorção específica do soluto. As contribuições eletro-cinéticas também não são consideradas. O parâmetro de transporte de massa difusivo é impulsionado por, e varia com, a pressão, gradientes de temperatura e de concentração ou, de modo mais geral, pelas diferenças no potencial químico. Embora a autodifusão trate seus movimentos individuais em um meio de moléculas idênticas ou semelhantes, difusão mútua, ou interdifusão, representa mais uma propriedade coletiva que determina a rapidez com que dois componentes diferentes são misturados. Como foi expresso antes no item 2.1 no limite da velocidade do fluxo, v , tendendo pra zero, a ECD (2.5) se reduz à equação de difusão de Fick. Embora ainda não se disponha de uma abordagem geral, que abranja um tratamento analítico completo de difusão, soluções para a equação de Fick, com condições de contorno definidas adequadamente, têm sido muito bem resolvidas. As condições iniciais exatas referentes à distribuição de concentração na célula de fluxo em análise não são conhecidas, a priori, com exatidão. Contudo, sob condições de fluxo laminar, e com um perfil inicial de concentração do soluto ideal, retangular, fornecido na entrada da célula de fluxo, esse perfil inicial vai-se transformando aproximadamente em uma forma Gaussiana, simétrica em relação ao centro da célula de fluxo. No limite assintótico $v \rightarrow 0$, o tempo de resposta transitório total, onde a parte convectiva está incluída, ($\tau_{tot} = \tau_D + \tau_{CV}$), reduz-se ao tempo de resposta τ_D , o qual é determinado apenas pelo transporte difusivo. Esta quantidade representa o tempo decorrido até que o equilíbrio seja alcançado, e uma distribuição homogênea seja estabelecida entre as paredes da célula microfluídica, separadas por uma distância H . Uma das paredes se constitui na superfície sensível do sensor SPR acoplado, com uma faixa de detecção que se estende $0,5 \mu m$ dentro da célula de fluxo [26]. Limitando-se às condições ideais de uma geometria unidimensional, a concentração do soluto pode ser associada à função de erro complementar erfc [76]. Assumindo condições iniciais em $t = 0$ como $C(x, 0) = 0$, e as condições de contorno como $C(0, t) = C_0$ e $C(\infty, t) = 0$, a concentração do soluto é dada por:

$$C(x, t) = C_0 \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{L_D}\right), \quad (2.18)$$

sendo L_D , comprimento de difusão, dado por :

$$L_D = 2(D\tau_D)^n, \quad (2.19)$$

na qual C_0 é a concentração inicial, D é a difusividade específica do material, x é a distância, τ_D é o tempo de difusão e n fator de escala [76]. O comprimento de difusão, L_D , para a geometria utilizada que é simétrica em relação ao eixo axial, é considerado como $L_D = H/2$ onde H é a distância entre as paredes. O comprimento das placas (ou superfícies) é considerado bem grande em relação à distância entre elas e, assim, pode-se reescrever a expressão (2.19) como:

$$L_D = \frac{H}{2} = 2(\Delta\tau_D D)^n, \quad (2.20)$$

para $n = 0, 5$. O expoente n define a relação de escala, a qual pode ser modificada, quando a distribuição difusiva corrente muda o comportamento de uma dimensão para duas, ou até três, dimensões. Com as condições de contorno simétricas, já mencionadas, entre as paredes da célula de fluxo com distância H , a difusividade pode ser determinada para o caso de 1-dimensão, a partir do tempo de subida do sinal ($\Delta\tau_D$) e a partir da expressão (2.20), como se segue:

$$D = \frac{H^2}{16\Delta\tau_D}. \quad (2.21)$$

Esta expressão permite a determinação experimental direta do coeficiente de transporte molecular a partir das características dinâmicas da célula de fluxo, considerando $n = 0, 5$. Alternativamente, para verificação e confirmação da abordagem aqui proposta, as características dinâmicas da difusão dispersiva podem ser aplicadas. Usando o método de dispersão de Taylor [30], para um soluto em solução aquosa transportado durante um período de tempo t , de um reservatório para a célula microfluídica, através de um longo tubo de raio interno R_0 , um pulso inicial de concentração do soluto na forma de um pulso δ lentamente muda e se transforma numa distribuição de concentração aproximada da Gaussiana. De acordo com [31] e [30], a variação do índice de refração correspondente à variância Δt_b^2 , medida com o sensor de ressonância de plasmon de superfície quando a solução passa através da célula microfluídica, pode ser expressa por:

$$\Delta t_b^2 = 2D \frac{t}{u^2} + R_0^2 \frac{t}{24D}. \quad (2.22)$$

Esta expressão se aplica, desde que o fluxo da solução à velocidade média u , seja laminar, e o tempo de dispersão exceda o limite mínimo, ou seja: $t \gg (3 \times 8)^2 D$ ou de forma equivalente $L/u = (3 \times 8)^2 D$, sendo L o comprimento do tubo. Para a solução na fase gasosa, o primeiro termo, da expressão (2.22) é dominante, devido aos altos valores da difusividade. Como D é muitas ordens de magnitude menor na fase líquida, o primeiro termo do lado direito da mesma equação pode ser desprezado em relação ao segundo. O coeficiente de difusão pode ser determinado então por:

$$D = R_0^2 \frac{t}{24\Delta t_b^2}. \quad (2.23)$$

2.3 Biossensores

Por milhares de anos os seres humanos têm utilizado micro-organismos para fazer produtos e, ao fazê-lo, praticaram biotecnologia. A fermentação da cerveja é um exemplo de biotecnologia. Da mesma forma assim é o fermento de pão, vinho, iogurte, chucrute, queijo e vinagre. A biotecnologia é praticada sempre que processos biológicos são usados para produzir desde cervejas babilônicas a anticorpos monoclonais. Ao longo das últimas décadas a biotecnologia tem evoluído para uma tecnologia moderna, sem a qual o progresso da medicina seria dificilmente imaginável. A biotecnologia moderna tem um papel crucial tanto na investigação das causas moleculares de doenças assim como no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de melhores fármacos alvo. O objetivo da investigação diagnóstica é encontrar proteínas específicas que são adequadas para detectar alterações em um sistema biológico, que caracterizam doenças, chamadas de biomarcadores, ou detectar antígenos que são agentes externos ao organismo, e desenvolver testes para detectá-los em fluidos corporais dos pacientes (como sangue, urina, suor ou saliva). Os dispositivos utilizados para implementar esses testes são chamados de biossensores. O biossensor, que surgiu na década de 1960, com o trabalho pioneiro de Clark [47], [55], tem sido cada vez mais empregado numa variedade de aplicações. No contexto atual a definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), [77], de um sensor eletroquímico é frequentemente ci-

tada nos trabalhos científicos sobre biossensores: "Um biossensor electroquímico é um dispositivo integrado, o qual é capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa, específica, usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que é mantido em contacto directo espacial com um elemento de transdução electroquímico".

A figura a seguir 2.2 é um diagrama esquemático, onde são mostrados os componentes principais de um biossensor, onde o bioreceptor (A) é o elemento biológico de detecção (DNA, anticorpo, enzima ou microorganismo), que interage, converte, ou se liga especificamente, com o substrato/analito (S) de entrada (sangue, soro, urina, etc), para formar um produto químico, ou complexo de ligação (P), pelo desencadeamento de uma reação química específica. Esta reação é detectada pelo transdutor físico-químico B. Este converte a reação química, de alterações de densidade, massa, concentração ou sinal óptico (cor) em um sinal de saída útil, passível de quantificação. A saída do transdutor é amplificada (C), processada (D) e exibida (E) [78].

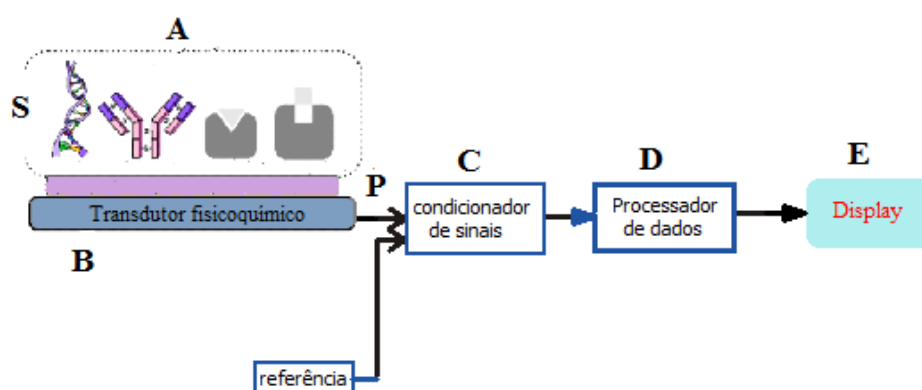


Figura 2.2: Diagrama esquemático com os componentes principais de um biossensor. Figura adaptada de [78]

O objetivo, portanto, de um biossensor é produzir sinais elétricos, digitais ou analógicos, que são proporcionais à concentração de um analito ou grupo de analitos [79], [80]. Esse dispositivo possibilita, em alguns casos, a detecção e quantificação de biomoléculas em um único passo. Para cada tipo de transdução pode haver uma variedade de estratégias alternativas, e cada abordagem pode ser aplicada a vários problemas analíticos em várias áreas: na saúde, alimentos e bebidas, na indústrias de processo, monitoramento ambiental, defesa e segurança. A concepção de sistemas integrados, estudo dos elementos sensíveis e padronização de métodos para melhorar

a sensibilidade, estabilidade e seletividade dos biossensores são áreas ainda a serem exploradas [81], [82],[83].

Conforme o bioreceptor, os biossensores podem ser classificados como: enzimáticos, imunobiossensores ou celulares [84], [85].

Conforme o transdutor, os biossensores podem ser classificados, em geral, como: eletroquímicos, elétricos, térmicos, ópticos e piezoelétricos [77].

Muitos são os métodos de detecção do sinal a ser quantificado: amperometria, potenciometria, condutividade, índice de refração, luminescência, fluorescência.

Conforme o tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, o biossensor pode ser classificado como catalítico ou de afinidade. Existem distintos tipos de receptores de bioafinidade como anticorpos, lecitinas completas, ácidos nucleicos, aptâmeros e polímeros sintetizados artificialmente (PNAs). A especificidade do reconhecimento do analito, pelo componente biológico ativo, aliada à sensibilidade do transdutor, tem gerado grande número de trabalhos na área de biossensor catalítico. No entanto, a determinação de níveis de concentrações aceitáveis de compostos poluentes e de drogas ou hormônios em química clínica requerem o desenvolvimento de metodologias confiáveis com detecção na ordem de $10^{-9} molL^{-1}$. Nesse caso a tecnologia imunológica, que é baseada na habilidade do anticorpo (AB) formar complexo com o correspondente antígeno (Ag) é essencial, pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a especificidade. Embora cada biossensor só possa ser realmente avaliado para uma determinada aplicação, é importante ter como referência padrões para critérios de desempenho seguindo, por exemplo, a norma da IUPAC de protocolos e definições [77]. Estes critérios recomendados incluem características de calibração (sensibilidade, faixa de concentração operacional e linear, detecção e limites de determinação quantitativa), seletividade, em estado estacionário e tempos de resposta transitória, produtividade de amostras, reprodutibilidade, estabilidade e vida útil. Os biossensores que utilizam anticorpos ou antígenos como elementos sensores são chamados de imunossensores. De forma geral, a premissa básica no desenvolvimento de um imunossensor está na sua capacidade em avaliar processos interfaciais e superficiais, e dessa forma, a técnica de ressonância de plasmon de superfície tem apresentado grande potencial para avaliação desses processos [84], [85].

2.4 Tecnologia de biossensores SPR

Dentre as diferentes rotas tecnológicas, os biossensores ópticos baseados no fenômeno de ressonância de plasmon de superfície (SPR) destacam-se na investigação de interações biomoleculares devido à alta seletividade e sensibilidade, ausência de marcadores radioativos ou bioquímicos e tempo de resposta de análise da amostra em poucos minutos (ou segundos). Neste tipo de biossensor SPR as variações do índice de refração da luz incidente num arranjo multi-camada são utilizadas para detectar a substância biológica de interesse. A sensibilidade típica do subsistema óptico é extremamente elevada (da ordem de 10^{-7} RIU) que, quando associada com a seletividade da reação antígeno-anticorpo, tem-se revelado como uma ótima alternativa para identificação de diversas substâncias biológicas nocivas à saúde humana [12].

Serão apresentados inicialmente os princípios da tecnologia SPR, em seguida uma descrição do sensor microfluídico SPR e um modelo matemático desse fenômeno, baseado nas equações de Fresnel.

2.4.1 Princípio dos sensores ópticos - SPR

Um plasmon de superfície é uma onda de densidade de carga que ocorre na interface entre um metal e um dielétrico. Um plasmon de superfície pode ser excitado por incidência de luz. A técnica de ressonância de plasmon de superfície pode ser descrita como uma interação que ocorre quando um raio de luz atinge a interface entre dois meios, com índices de refração distintos, um metal e um dielétrico, por exemplo,[42], como ilustrado na Figura 2.3.

O fenômeno de ressonância pode ser explicado como a seguir. Quando a luz se propaga de um meio de maior índice de refração (e.g,prisma) para um meio de menor índice (metal) e atinge a interface entre esses dois meios, em um ângulo de incidência maior que um ângulo limite ou crítico, (θ), indicado na Figura 2.3, a luz é totalmente refletida, para o meio de maior índice de refração. E, embora não haja perda de energia, uma parcela da luz incidente cria um campo elétrico evanescente. A componente horizontal do campo evanescente (\vec{K}_{sp}) penetra o metal e provoca uma oscilação da densidade de carga longitudinal (\vec{K}_x), ou seja, uma excitação de oscilações internas e coletivas dos elétrons livres que estão presentes na superfície do metal e que são denominadas de plasmon de superfície, ilustrado na janela (ampliação) na Figura 2.3. Para o ângulo de ressonância do plasmon de superfície (e para um dado comprimento da luz

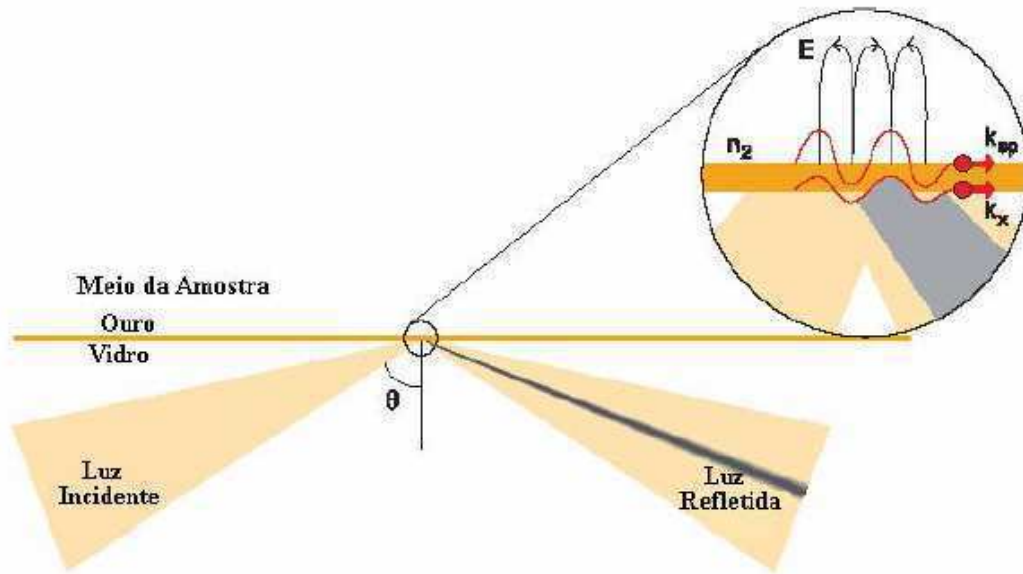


Figura 2.3: Princípio de ressonância do plasmon de superfície

incidente) a energia e o momentum, (ao longo da interface) do fóton incidente e da onda de densidade de carga, coincidem, e isso se constitui na condição de ressonância - ($\vec{K}_{sp} = \vec{K}_x$). A energia do fóton é então transferida para a onda de densidade de carga. Esse fenômeno pode ser observado como uma queda brusca na intensidade da luz refletida indicada por um feixe escuro na Figura 2.3. Ressonância de plasmon de superfície ocorre numa faixa que inclui a região de luz visível, e em metais como ouro, prata e cobre. A espessura do filme de metal deve ser uma fração do comprimento de onda da luz. O campo elétrico evanescente gerado na vizinhança do metal decresce exponencialmente com a distância da superfície do metal, com uma taxa de decaimento da ordem de 0,2 a 0,3 do comprimento de onda da luz. Mudanças nas propriedades ópticas (e.g. índice de refração) dessa região bem definida muito próxima da superfície do metal ($< 500nm$) irão, portanto, causar alterações no ângulo de ressonância (para um determinado comprimento de onda da luz incidente).

Para a configuração de Kretschmann [45], amplamente utilizada, um feixe de luz é focado sobre a película de metal. Para uma faixa de ângulos de incidência de luz, durante a projeção, o feixe refletido irá ter a mesma faixa de ângulos e forma da banda do feixe fornecido. Uma linha escura irá aparecer na banda refletida se o SPR ocorrer dentro desta faixa. Um perfil de intensidade desta banda pode ser monitorado e registrado, em tempo real, de forma não invasiva, em função da faixa

de ângulos, (método de interrogação angular) como mostrado na Figura 2.3. Quando biomoléculas se ligam à superfície, por exemplo, e alteram a massa da camada de superfície, o ângulo de SPR irá deslocar. Esta alteração no ângulo de ressonância pode ser detectada (correspondente à alteração em massa) em função do tempo. Para a mesma configuração, de outro modo, usando-se uma fonte de luz branca e um espectrômetro pode-se identificar o comprimento de onda para o qual ocorre a excitação do plasmon para um ângulo determinado de incidência da luz (método de interrogação de comprimento de onda). Essa oscilação, ou ressonância, é muito sensível aos índices de refração dos meios, e portanto, o comprimento de onda e o ângulo de incidência para os quais ocorre a ressonância, é função do índice de refração do material, ou amostra química, que estiver bem próxima da superfície do sensor [40]; e isso constitui o princípio para a utilização de SPR como biossensor [28].

A equação de Fresnel, baseado na teoria de Kretschmann, correlaciona a reflectância SPR com o índice de refração, ou constante dielétrica, do meio de ensaio, e a medida do índice de refração se correlaciona com a concentração do analito [86], [26]. A técnica baseada no sensor de ressonância de plasmon de superfície (SPR) é bem aplicada para os mapeamentos, não-invasivos e em tempo real, de perfis de concentração de substâncias ou compostos em análise e como biossensores de afinidade.

2.4.2 Sensor SPR integrado à célula microfluídica

O imunossensor, utilizado neste trabalho, baseado na tecnologia SPR, é um sistema biossensor em cuja superfície sensora (filme de metal) podem ser imobilizados anticorpos, antígenos ou fragmentos de antígenos, ou outro elemento biológico. O sensor SPR, acoplado ao sistema microfluídico, detecta eventos de ligações moleculares, unicamente pelo aumento da espessura da camada, ou cobertura de massa, que se origina a partir de ambos os tipos de interações de ligações específicas e não específicas entre moléculas. A técnica de ensaios com imunossensor SPR é um método de detecção analítico direto, rápido e que não precisa usar marcadores, ou seja, anticorpos ou antígenos conjugados a espécies eletroativas, tais como enzimas, radioisótopos, partículas metálicas, cromógenos. Esses marcadores podem alterar as características cinéticas, termodinâmicas e químicas dos sistemas de análise.

O sistema microfluídico SPR de detecção, incluindo os componentes periféricos, é represen-

tado na Figura 2.4. É composto de uma microcélula de fluxo (F), onde passa o analito, uma fonte de luz polarizada (L), um prisma (P), a superfície sensível do sensor SPR (S) acoplado à célula e um sensor óptico que mede a intensidade da luz refletida (C) (câmera ou arranjo de fotodiodos). O elemento sensível, ou superfície sensora, (S), consiste em um substrato polimérico coberto com um filme fino de metal (ouro, cobre, prata).

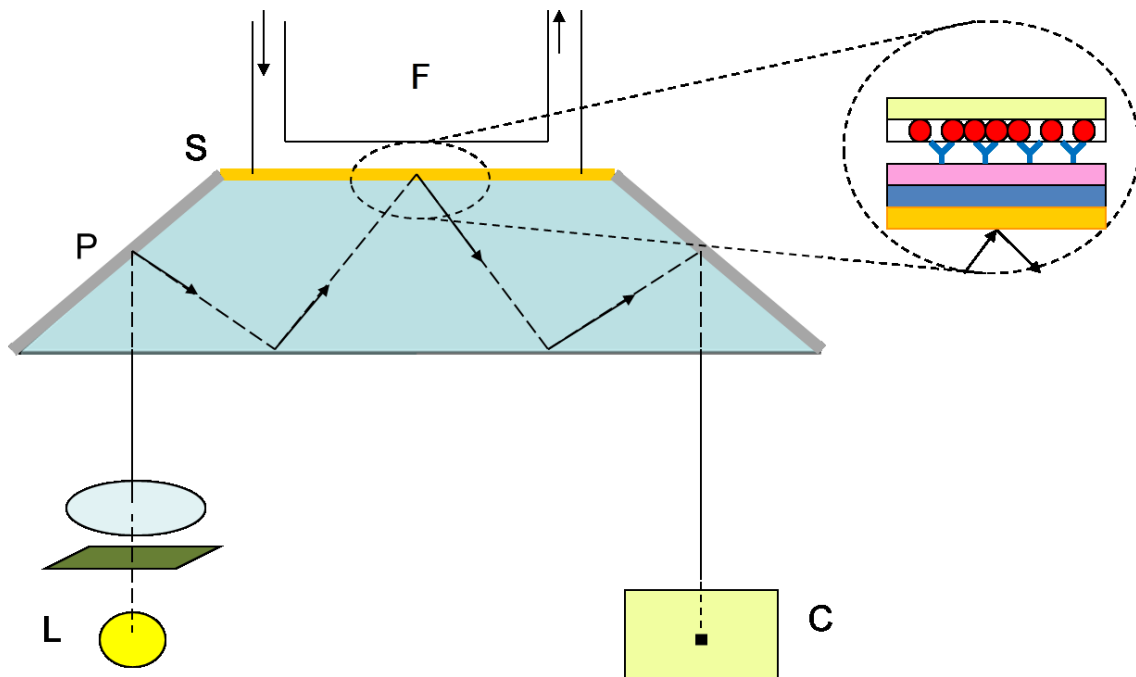


Figura 2.4: Sistema detector SPR - célula microfluídica com sensor, prisma, fonte de luz e câmera

O *chip* sensor polimérico é coberto com um filme fino de ouro puro (50 nm), já descrito em detalhe na referência [26]. Na superfície do substrato polimérico coberto com ouro puro é imobilizado o agente catalizador que irá se ligar ao analito a ser detectado. Essa superfície S , desse sistema imunossensor, é composta de camadas para imobilização do agente biológico (anticorpos, antígenos ou fragmentos de antígenos). Para explicar o funcionamento do imunossensor SPR, pode-se supor que uma amostra de analito (e.g. antígeno) numa solução, ao ser admitida através da célula de fluxo (F), flui sobre a superfície de detecção (S) funcionalizada previamente. O antígeno, se estiver presente na solução, vai ser anexado à camada mais externa da superfície funcionalizada, que seria, no exemplo, uma camada imobilizada de anticorpos. Quando biomoléculas se ligam à camada imobilizada e alteram a concentração (ou espessura) de massa da superfície sensora, o ângulo de ressonância é deslocado. Esta alteração no ângulo de ressonância é monitorada de forma não invasiva, em tempo real, proporcional à alteração em massa da ligação antígeno-anticorpo

(pelo sensor óptico C). O sinal obtido do sensor óptico (C) é processado digitalmente para extrair as variações do índice de refração da luz. O registro dos dados é feito através de um sensorgrama. É a indicação, do monitoramento no tempo, da variação do índice de refração para cada etapa de admissão de substâncias na célula de fluxo do sensor. A construção do sensorgrama é ilustrada na Figura 2.5. A cada mudança de concentração na superfície do sensor corresponde uma mudança no ângulo de ressonância, ou seja, da posição do ponto mínimo de intensidade na curva SPR e respectivo valor de índice de refração.

Curvas SPR

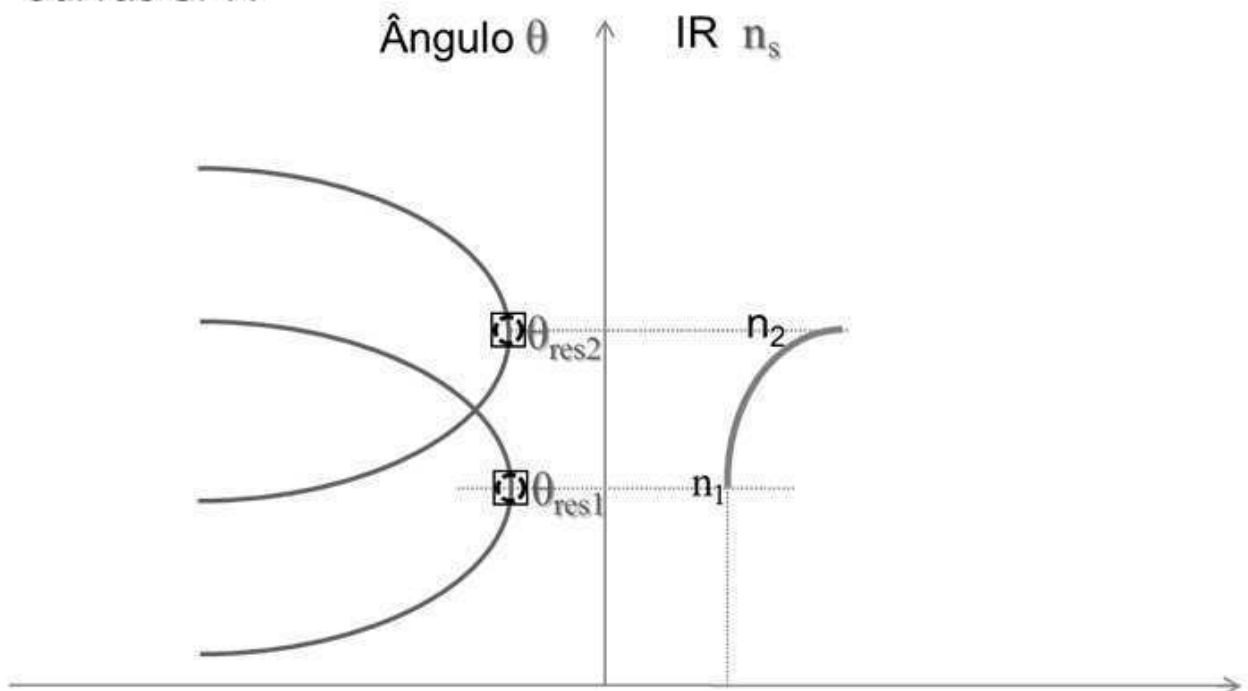


Figura 2.5: Construção do sensorgrama a partir das curvas SPR - a cada mudança do ângulo de ressonância θ_{res} corresponde um valor de índice de refração n

Um exemplo de sensorgrama é ilustrado na Figura 2.6.

No sensorgrama podem ser indicadas as várias etapas do ensaio como limpeza e adição de substâncias para a construção da camada de imobilização (do antígeno ou anticorpo, por exemplo) e posterior admissão do analito e camadas de ampliação do sinal (reforço), quando for o caso.

No ítem a seguir é feita a descrição do sistema de detecção SPR por um modelo matemático.

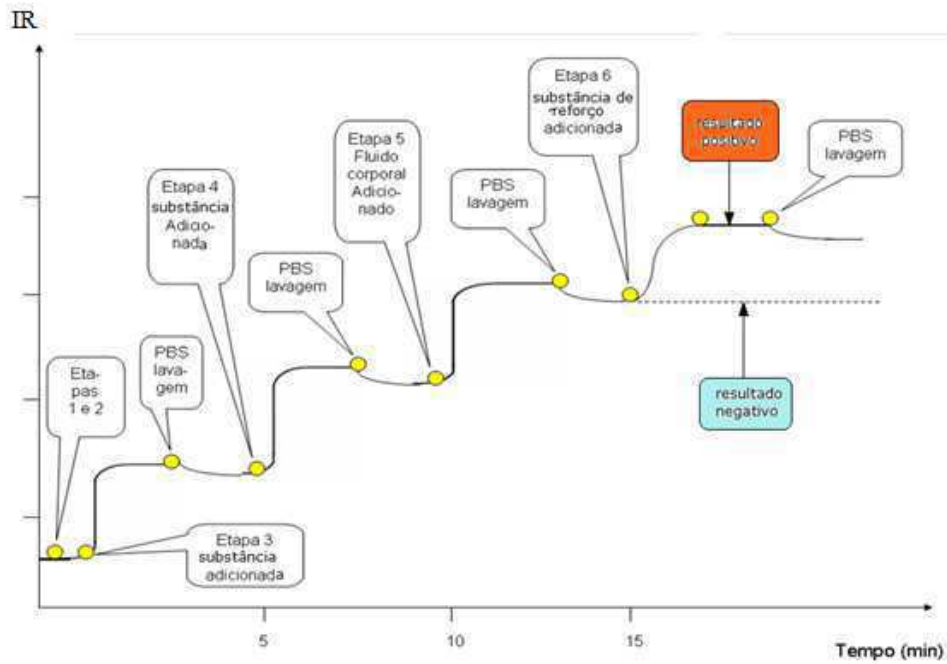


Figura 2.6: Modelo de sensorgrama - indicação, do monitoramento no tempo, da variação do índice de refração para cada etapa de admissão de substâncias na célula de fluxo do sensor.

2.4.3 Modelo de Fresnel para o sistema de detecção SPR

Para representar o modelo do sistema de detecção SPR, consideramos uma equação de Fresnel [86] para uma configuração de interface de três camadas, relativas à polarização-p, em que o sistema de detecção consiste de um prisma-metal-camada de detecção (de sensoriamento), como mostrado na Figura 2.7. Na seguinte descrição, um prisma de vidro, uma película metálica e uma camada de sensoriamento são abreviados p , m , e s , respectivamente.

Quando a luz p-polarizada incide em um ângulo de θ , a reflectância da luz (R) é dada pelas equações de Fresnel para três camadas, como se segue:

$$R = \left| \frac{r_{pm} + r_{ms} \exp(2ik_{mz}d)}{1 + r_{pm}r_{ms} \exp(2ik_{mz}d)} \right|, \quad (2.24)$$

com

$$r_{pm} = \left| \frac{k_{pz}\epsilon_m - k_{mz}\epsilon_p}{k_{pz}\epsilon_m + k_{mz}\epsilon_p} \right|, \quad (2.25)$$

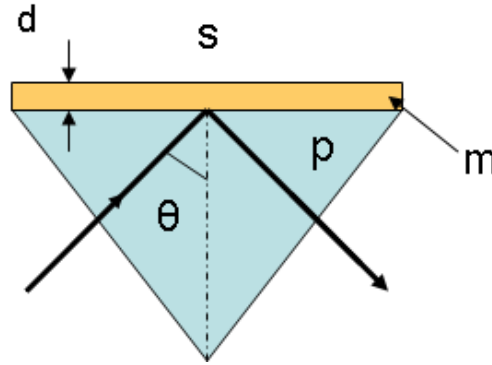


Figura 2.7: Configuração de Kretschmann de uma interface de três camadas: sensoriamento-prisma-metal. θ é o ângulo de incidência e d é a espessura do filme metálico. Figura adaptada de [86]

$$r_{ms} = \left| \frac{k_{mz}\varepsilon_s - k_{sz}\varepsilon_m}{k_{mz}\varepsilon_s + k_{sz}\varepsilon_m} \right|, \quad (2.26)$$

e

$$k_{jz} = \left(\varepsilon_j \frac{\omega^2}{c^2} - k_x^2 \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2.27)$$

para $j = p, m, s$

$$k_x = \frac{\omega}{c} (\varepsilon_p)^{\frac{1}{2}} \sin \theta, \quad (2.28)$$

na qual r_{pm} e r_{ms} são a amplitude da reflectância dada pelas fórmulas de Fresnel [86] para polarização-p para as camadas de interface prisma-metal e metal-camada sensível, respectivamente; ε_j e k_{jz} são a constante dielétrica e a componente perpendicular do vetor de onda para a interface no meio j ; k_x é o componente do vetor de onda incidente, paralelo à interface; d é a espessura do filme metálico; ω é a frequência angular da luz incidente, e c é a velocidade da luz. As características ópticas de cada camada são descritas utilizando a constante dielétrica. Na camada de prisma, o efeito de dispersão pode ser ignorado. A constante dielétrica da camada ε_p do prisma é descrito por:

$$\varepsilon_p = n_p^2, \quad (2.29)$$

na qual n_p é o índice de refração do prisma.

A onda de superfície que se propaga ao longo da interface entre o metal e a superfície de

sensoriamento (na vizinhança do filme de metal) tem como vetor de propagação k_{sp} que é dado pela seguinte expressão, considerando a parte $Re(k_{sp}) \gg Im(k_{sp})$ para o metal.

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_s}{\varepsilon_m + \varepsilon_s} \right)^{\frac{1}{2}}. \quad (2.30)$$

Para ocorrer a ressonância deve haver um acoplamento entre a frequência e energia de oscilação da onda do plasmon com a onda de incidência (fótons) da luz p-polarizada. Portanto, na condição de ressonância, a componente horizontal do vetor de onda dos fótons (k_x) será igual ao vetor de onda longitudinal do plasmon (k_{sp}) ou seja:

$$k_x = \frac{\omega}{c} (\varepsilon_p)^{\frac{1}{2}} \sin \theta = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_s}{\varepsilon_m + \varepsilon_s} \right)^{\frac{1}{2}} = k_{sp}, \quad (2.31)$$

ou substituindo cada ε por n^2 (equação (2.29), tem-se, para ω constante, na interrogação angular:

$$k_x = n_p \sin \theta = \left(\frac{n_m^2 \cdot n_s^2}{n_m^2 + n_s^2} \right)^{\frac{1}{2}} = k_{sp}, \quad (2.32)$$

na qual n_p , n_m , n_s são os índices de refração do prisma, do metal e da camada sensora (detecção) S , respectivamente, e na condição de ressonância, então, $\theta = (\theta_{res})$, o ângulo de ressonância, medido pelo sensor SPR, associado ao mínimo da intensidade da luz refletida do filme de metal. A intensidade da parte imaginária ε_{mi} da constante dielétrica do filme metálico ($\varepsilon_m = \varepsilon_{mr} + j\varepsilon_{mi}$) pode ser considerada muito menor que a parte real, $\varepsilon_{mi} \ll \varepsilon_{mr}$, para metais como ouro ou prata [26]. A seguinte expressão, então, pode ser obtida a partir da equação (2.32) para o índice de refração do elemento sensor (n_s):

$$n_s = \left[\frac{\varepsilon_{mr} (n_p \sin \theta_{res})^2}{\varepsilon_{mr} - (n_p \sin \theta_{res})^2} \right]^{\frac{1}{2}}. \quad (2.33)$$

Uma formulação do modelo de Fresnel para quatro camadas, ilustrada na Figura 2.8, foi descrita em [26]. O sistema consiste de: 1) um filme de metal com espessura d_1 e constante dielétrica complexa ε_m ; 2) um substrato (semi-infinito) com índice de refração n_2 ; 3) um elemento sensor com espessura d_3 e índice de refração n_3 e 4) um meio ambiente semi-infinito (solução com analito) com índice de refração n_4 .

Um índice de refração eficaz (n_{eff}^s) pode ser definido, como mostrado em [26], para um meio semi-infinito sobre a película de metal, para representar a resposta do sensor SPR como um

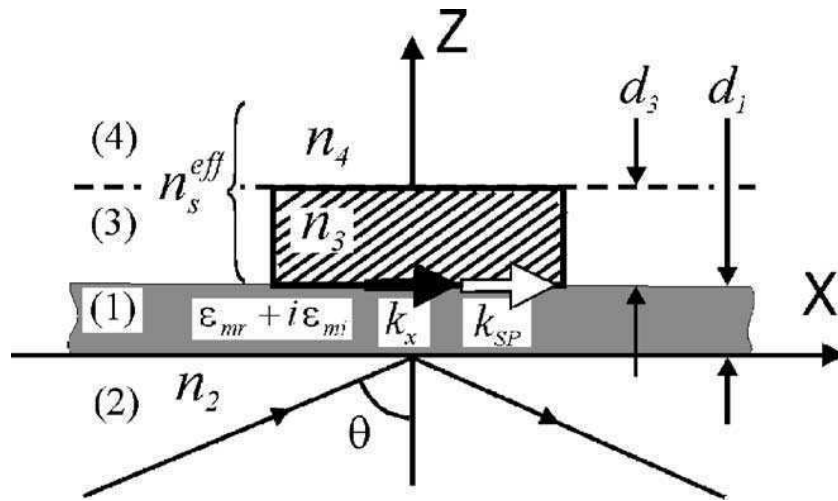


Figura 2.8: Configuração de interface de quatro camadas para um sensor SPR. Figura adaptada de [26]

sistema de camadas múltiplas de filmes bioquímicos. Neste caso, a expressão linear para o índice de refração eficaz, (n_{eff}^s) , de um filme fino molecular adsorvido, com uma espessura de camada homogênea eficaz, d_3 , de acordo com [26] é dada por:

$$n_{eff}^s = \left[\frac{2\pi d_3 (-\epsilon_{mr} n_4^2)^{\frac{3}{2}} (n_3^2 - n_4^2)}{\lambda (\epsilon_{mr} - n_4^2)^2 n_3^2} \right] + n_4. \quad (2.34)$$

A saída do sistema SPR é a mudança do índice de refração eficaz:

$$\Delta n_{eff}^s = (n_{eff}^s - n_4). \quad (2.35)$$

Esta expressão é a variação do índice de refração de um filme molecular adsorvido com n_4 sendo o índice de refração da solução aquosa PBS (massa) próxima à superfície, e n_3 correspondendo ao índice de refração da proteína (massa) adsorvida na camada de detecção. Na Figura 2.9a está indicado o decaimento do campo elétrico para uma configuração de interface de quatro camadas. A variação não linear denominada Δn_{eff}^s com espessura de camada d_3 , calculada com base num modelo de quatro camadas de Fresnel, está ilustrada na Figura 2.9b, com a linha contínua. O índice de refração eficaz (n_{eff}^s) é traçado em função da espessura (d_3) do elemento sensor (curva sólida). A saturação ocorre para $d_3 > 300nm$, que também é o limite da faixa de sensibilidade do método SPR para determinação da espessura. A equação (2.34) está representada como uma linha tracejada na Figura 2.9. Nesta figura é ilustrada a aproximação linear, dada pelas equações

(2.33) e (2.34). Para $d_3 \leq 100nm$, há uma boa concordância entre as duas expressões. Assumindo cobertura de superfície completa e homogênea com 100% do fator de preenchimento, a possível variação máxima ideal do índice de refração, denominada Δn_{mol}^{max} , pode ser calculada, desde que d_3 e n_3 sejam conhecidos.

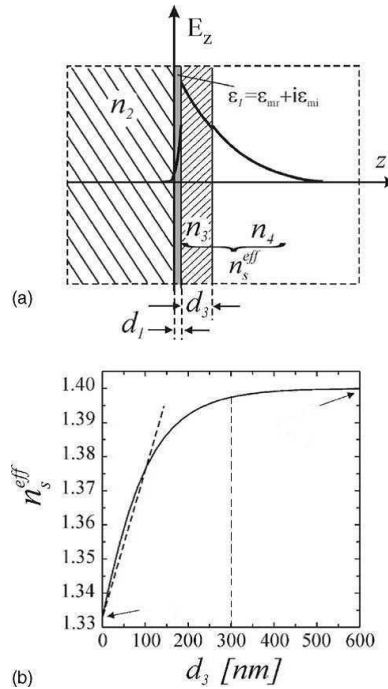


Figura 2.9: a) Configuração de quatro camadas para a excitação de plasmon de superfície com os índices de refração, constantes dielétricas e as espessuras das camadas indicados. b) Índice de refração eficaz em função da espessura. Figura adaptada de [26]

2.5 Princípios de imunologia

A capacidade que o corpo humano tem de resistir a quase todos os tipos de microrganismos ou toxinas, que tendem a danificar os tecidos e os órgãos, chama-se imunidade [87]. Essa imunidade pode ser de duas formas: inata ou adquirida. A chamada imunidade inata inclui os seguintes componentes: a) fagocitose de bactérias e outros invasores por leucócitos e por células do sistema de macrófagos teciduais; b) destruição de microrganismos ingeridos, pelas secreções ácidas do estômago e enzimas digestivas; c) resistência da pele à invasão por microrganismos; d) presença no sangue de determinados compostos químicos que se fixam aos organismos estranhos, ou às toxinas, destruindo-os tais como lisozima, polipeptídeos básicos, o complexo do complemento e

linfócitos destruidores naturais. Essa imunidade inata torna o corpo humano resistente a doenças como a algumas infecções virais paralíticas de animais, peste bovina e cinomose. Por outro lado muitos animais inferiores são resistentes e imunes a muitas doenças humanas como poliomielite, caxumba, sarampo e sífilis. Contudo, grande parte da imunidade é constituída pela imunidade adquirida que se desenvolve depois do primeiro ataque ao corpo por bactérias, vírus, toxinas e até mesmo tecidos estranhos de outros animais. Essa imunidade adquirida é induzida por sistema imune especial que produz anticorpos e/ou linfócitos ativados, os quais atacam e destroem os microrganismos invasores específicos, ou as toxinas. Com frequência a imunidade adquirida é capaz de conferir notável proteção. Existem no organismo dois tipos básicos, e intimamente relacionados, de imunidade adquirida. Em um deles, o organismo produz anticorpos circulantes, que são globulinas, no plasmon sanguíneo, capazes de atacar os agentes invasores, denominados de antígenos. Esse tipo de imunidade é chamada de imunidade humoral ou de células B, visto que são os linfócitos B que produzem os anticorpos. O segundo tipo de imunidade adquirida é obtido pela formação de grande número de linfócitos T ativados, cuja função consiste, especificamente, em destruir o agente estranho. Esse tipo de imunidade é a imunidade celular ou imunidade de células T [87].

2.5.1 Antígenos

Um antígeno (Ag) é qualquer substância (moléculas ou fragmentos), capaz de induzir uma resposta (produzindo anticorpos e linfócitos) quando introduzida num animal vertebrado. Ambos os tipos de imunidade adquirida, são iniciados por antígenos. Cada toxina, ou cada tipo de microrganismo, quase sempre contém na sua constituição um ou mais componentes químicos específicos que diferem de todos os outros compostos. Em geral essas substâncias são proteínas ou grandes polissacarídeos que são chamadas de antígenos. Para que determinada substância seja antigênica esta deve ter peso molecular maior ou igual a $8000Da$. O processo de antigenicidade geralmente depende da ocorrência regular de grupos moleculares, denominados de epítopes, sobre a superfície da grande molécula, sendo uma característica estereoquímica (ramo da química que estuda as características tridimensionais das moléculas)[87].

2.5.2 Anticorpos

Os linfócitos B secretam, ativamente, anticorpos que são os agentes reativos. Esses anticorpos consistem em grandes moléculas de proteína capazes de se combinar com o agente antígeno e destruí-lo. Os linfócitos B exibem diversidade ainda maior que os linfócitos T, produzindo assim milhões de tipos de anticorpos, com diferentes reatividades específicas. Após o pré-processamento, os linfócitos B migram para o tecido linfoide em todo o organismo, onde se alojam próximo às áreas dos linfócitos T. São armazenados no tecido linfático milhões de linfócitos B e T pré-formados, que são capazes de produzir tipos altamente específicos de anticorpos, ou de células T, quando estimulado por antígenos apropriados. Cada um desses linfócitos pré-formados é capaz de produzir apenas um tipo de anticorpo ou um tipo de célula T, com tipo único de especificidade. E apenas o tipo específico de antígeno com o qual pode reagir é capaz de ativá-lo [87].

Uma vez que o linfócito específico é ativado por seu antígeno, se reproduz intensamente, formando uma grande quantidade de linfócitos do mesmo tipo. Se for linfócito B, sua progênie secretará o tipo específico de anticorpos que irá circular pelo corpo. Todos os diferentes linfócitos que são capazes de produzir uma especificidade de anticorpo ou de célula T são denominados clones de linfócitos. Os linfócitos de cada clone são semelhantes e são derivados, originalmente, de um linfócito ou de alguns linfócitos imaturos de seu tipo específico. Para cada linfócito T, ou B, funcional que é formado, a estrutura gênica codifica apenas uma só especificidade antigênica. A seguir, essas células maduras transformam-se nas células T e B, altamente específicas, que se disseminam pelo tecido linfoide [87].

Cada clone de linfócitos, então, responde a apenas um só tipo de antígeno, ou a vários antígenos semelhantes que têm quase exatamente as mesmas características estéreoquímicas. A razão para isso é a seguinte: cada um dos linfócitos B tem na superfície 100.000 moléculas de anticorpos que irão reagir de modo altamente específico com apenas um tipo específico de antígeno. Por conseguinte, quando o antígeno apropriado surge, este se fixa imediatamente à membrana celular. Essa fixação leva ao processo de ativação. A maioria dos antígenos ativa, ao mesmo tempo, tanto os linfócitos T quanto os linfócitos B. Algumas das células T, que são formadas, denominadas células auxiliares, secretam substâncias específicas (linfocinas) que ativam os linfócitos B específicos. Na verdade, sem a ajuda dessas células T, auxiliares, a quantidade de anticorpos produzida

pelos linfócitos B é normalmente pequena.

Antes da exposição a um antígeno específico, os clones de linfócitos B permanecem inativos no tecido linfóide. Com a entrada de antígeno estranho, os macrófagos fagocitam (absorvem e digerem) o antígeno e o apresentam aos linfócitos B adjacentes. Os linfócitos B para o antígeno aumentam de tamanho, imediatamente, e assumem o aspecto de linfoblastos. Alguns linfoblastos passam por diferenciação adicional, formando plasmoblastos, precursores dos plasmócitos. Alguns outros linfoblastos, contudo, não se diferenciam para formar plasmócitos e formam alguns novos linfócitos B, semelhantes aos do clone original. A população de células B do clone especificamente ativado aumenta acentuadamente e os novos linfócitos B são acrescentados aos linfócitos originais do clone. Eles também circulam por todo o corpo, povoando todo o tecido linfóide. Entretanto, do ponto de vista imunológico, permanecem inativos até serem, outra vez, ativados por nova quantidade do mesmo antígeno, (ou por um sub-tipo do mesmo antígeno). Esses linfócitos são denominados células de memória. A exposição subsequente ao mesmo antígeno provoca resposta humoral muito mais rápida e muito mais potente por essa segunda exposição, visto que existem muito mais células de memória do que linfócitos B originais do clone específico. Na Figura 2.10 são mostradas as diferenças entre a resposta primária e a resposta secundária; esta última ocorre depois da segunda exposição ao mesmo antígeno [87], [66].

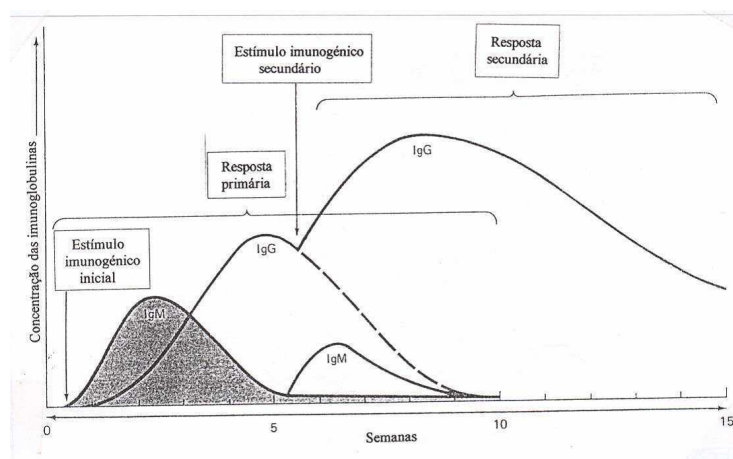


Figura 2.10: Respostas dos anticorpos, em função do tempo, às injeções primária e secundária de determinado antígeno. Gráfico adaptado de [87]

O tempo de resposta da defesa na infecção primária é muito maior que na secundária. Nesta última, em geral, os anticorpos surgem rapidamente, a defesa é mais potente e produz anticorpos durante vários meses. Isto explica porque a imunização (e vacinas) é normalmente feita pela in-

jeção de antígenos, em doses múltiplas, com intervalos de várias semanas, ou vários meses, entre as injeções. No caso da infecção por dengue, existem quatro diferentes sorotipos oficialmente reconhecidos, DENV(1,2,3,4), e estes diferem em sua atividade antigênica [88], [89]. Um outro tipo, DENV5, foi descoberto na Ásia mais recentemente, porém está ainda restrito a uma pequena região [18]. O comportamento da imunidade é diferente do que acontece normalmente em outras infecções. A infecção primária confere imunidade protetora ao longo da vida contra o sorotipo infectante, mas não provê a proteção cruzada contra qualquer um dos outros sorotipos. Quando ocorre infecção secundária por um sorotipo do vírus diferente do primeiro, a defesa, que é a memória guardada do sorotipo primário, é ativada, por ser originada do antígeno semelhante. Essa defesa é mais potente que na infecção primária, porém não neutraliza o novo sorotipo infectante, por este ser de outro tipo. O organismo, então, continua produzindo mais anticorpos. Essa defesa exacerbada provoca danos ao organismo. Daí porque a ocorrência de DHF e de DSS é mais provável ocorrer numa infecção secundária, quando envolve exposição a um sorotipo DENV diferente do primeiro [68], [90] e [91].

Os anticorpos são gamaglobulinas denominadas imunoglobulinas com pesos moleculares entre 160 KD e 970 KD. Todas as imunoglobulinas são formadas pela combinação de cadeias polipeptídicas leves e pesadas e têm uma estrutura básica semelhante. A maioria com duas cadeias leves (L, do inglês light) idênticas e duas cadeias pesadas (H, do inglês heavy), também idênticas, conforme ilustrado na Figura 2.11, ligadas entre si por forças não covalentes e ligações bissulfito [87]. As diferentes classes distinguem-se pelas diferentes cadeias pesadas, sendo as cadeias leves iguais em todas as classes. Cada cadeia pesada é paralela a uma cadeia leve em uma de suas extremidades, formando, assim, um par pesado-leve; existem sempre pelo menos dois desses pares em cada molécula de imunoglobulina. Existem cinco classes gerais de anticorpos denominados IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. A abreviatura Ig refere-se à imunoglobulina, enquanto as outras cinco letras (M,G,A,D e E) designam as respectivas classes. A IgG, que é um anticorpo bivalente, constitui cerca de 75 por cento dos anticorpos no indivíduo normal e a IgM é um marcador utilizado para confirmação de infecção recente (aguda) por um patógeno e só está presente no sangue durante um período limitado; no caso de dengue durante 80-90 dias após a infecção. Na Figura 2.11 é ilustrada a estrutura do anticorpo IgG típico. Este é composto de duas cadeias polipeptídicas pesadas H (de massa molecular $50KDa$), e duas cadeias polipeptídicas leves L (de massa molecular $25KDa$) ligadas por uma ponte bissulfito simples. A extremidade característica de cada

cadeia leve, e de cada cadeia pesada, é denominada região variável, enquanto o restante da cadeia é conhecido como região constante. A região variável é diferente para cada especificidade do anticorpo, sendo essa a região que se liga especificamente a um tipo particular de antígeno. A região constante do anticorpo determina outras propriedades, estabelecendo certos fatores como difusibilidade do anticorpo nos tecidos, aderência do anticorpo a estruturas específicas no interior dos tecidos, fixação ao complexo do complemento, facilidade com que os anticorpos atravessam as membranas e outras propriedades biológicas do anticorpo [87].

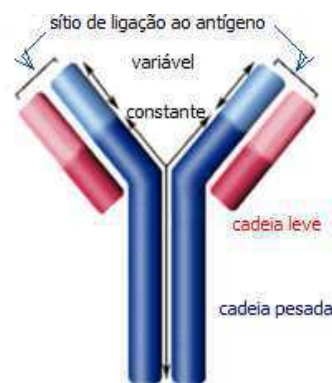


Figura 2.11: Estrutura do anticorpo IgG com duas cadeias pesadas e duas leves. Figura adaptada de [87]

O antígeno se liga a dois sítios diferentes sobre as regiões variáveis das cadeias. Estes dois locais de ligação encontram-se na extremidade (região hipervariável) de ambos os braços da molécula em forma de Y e consistem numa "armação" constituída por uma sequência relativamente estável de aminoácidos interrompida por várias regiões com sequências altamente variáveis. Estas regiões hiper-variáveis (paratopos) interagem para formar os dois locais de ligação altamente específicos aos antígenos. Como já mencionado, cada anticorpo é específico para determinado antígeno. Essa especificidade se deve à organização estrutural singular dos aminoácidos nas porções variáveis de ambas as cadeias leve e pesada. A organização dos aminoácidos tem forma estérica diferente para cada especificidade antigênica, de modo que, quando o antígeno entra em contato com ela, múltiplos grupamentos prostéticos do antígeno ajustam-se, como imagem especular, com os do anticorpo, permitindo assim a formação rápida de ligação firme entre o anticorpo e o antígeno. Quando o anticorpo é altamente específico, existem tantos sítios de ligação que o acoplamento antígeno-anticorpo é extremamente forte. Essa ligação é mantida por: ligações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, atrações iônicas e forças de van der Waals. O anticorpo

combina-se especificamente com o correspondente antígeno ou hapteno (substância de baixo peso molecular que por si só não é imunogênica, mas pode se ligar ao anticorpo específico), formando um complexo. Essa interação é caracterizada pela constante de afinidade, que é a medida da força de ligação do anticorpo ao antígeno, definida no equilíbrio. No anticorpo bivalente, ilustrado na Figura 2.11, são mostrados dois sítios variáveis para a ligação do antígeno.

2.5.3 Interação antígeno- anticorpo

Um antígeno tem duas formas de atividade. Por um lado, pode estimular um animal a produzir anticorpos que irão reagir especificamente com o antígeno. Este aspecto é conhecido por imunogenicidade. Por outro lado, deve ser capaz de se combinar com o anticorpo específico produzido, ao que se chama antigenicidade da partícula [87]. Na Figura 2.12 é ilustrada a interação entre um antígeno e anticorpos específicos produzidos pelo estímulo deste.

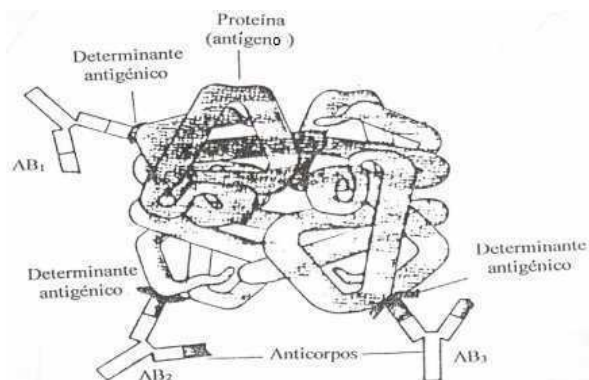


Figura 2.12: Interação entre um antígeno e anticorpos específicos correspondentes. Figura adaptada de [87]

As globulinas estão presentes no soro de todos os animais, mas, depois de estes sofrerem imunização, aparecem novos tipos, que diferem dos inicialmente existentes, pelo fato de reagirem, especificamente, com o agente imunogênico. Assim, os anticorpos encontrados num antissoro (soro após imunização) formam uma população heterogênea de imunoglobulinas, que se distinguem pelas suas propriedades físicas, químicas e serológicas. A força da interação antígeno-anticorpo (afinidade) pode ser reversível por ação da temperatura, pH e estado de conservação dos solventes. Se estes fatores sofrerem alterações significativas, os resultados de testes, que fazem uso de antígeno e anticorpos, podem ser alterados.

Denomina-se avidéz a capacidade de formação de complexos imunológicos estáveis que está diretamente relacionada com a quantidade de locais de combinação presentes na imunoglobulina e com a sua especificidade. Anticorpos com baixa avidéz são muito específicos e apenas reagem com determinantes de antígenos homólogos, enquanto anticorpos com elevada avidéz - antígeno heterólogos, são menos específicos e reagem também, ainda que debilmente, com determinantes ligeiramente diferentes.

Uma molécula de proteína antigênica pode ter vários determinantes ou epítopes diferentes, na sua superfície, que podem ser reconhecidos pelo receptor da molécula de IgG de algumas linhagens de linfócitos B. Deste modo, para qualquer antígeno com estas características, pode haver muitos linfócitos B com diferentes locais de ligação que serão estimulados pelo antígeno. Disto resulta a formação de anticorpos policlonais. No entanto, e como seria desejável, os linfócitos B não podem ser multiplicados *in vitro*. Para tentar ultrapassar este problema, promoveu-se a fusão entre estas células (retiradas de um camundongo imunizado) e uma linhagem de células de mieloma cancerígeno (e portanto de crescimento contínuo) de camundongo. Com este procedimento, conseguiu-se seleccionar células individuais (hibridomas) com capacidade biossintética de produzir um único tipo de anticorpos, que são os anticorpos monoclonais, a partir de um único tipo de linfócitos B. Esta técnica encontra-se ilustrada na Figura 2.13. Uma vez seleccionada uma linhagem de células de hibridoma, uma quantidade infindável desse mesmo anticorpo pode ser obtida, pois o hibridoma pode ser imortalizado por armazenamento em nitrogénio líquido e infinitamente reproduzido. E por reconhecerem um só epítope, os anticorpos monoclonais (MABs) são capazes de diferenciar patógenos sistematicamente próximos, como no caso dos diferentes tipos DENV(1,2,3,4). Anticorpos monoclonais podem ser utilizados, portanto, na tipificação viral. Os MABs são usados em testes ELISA para a detecção de vírus.

2.5.4 Métodos de diagnósticos da presença de vírus

São os seguintes os métodos mais utilizados para se detectar a presença de vírus em amostras de fluido corporal de um organismo infectado:

- Diagnóstico sorológico - refere-se à detecção de anticorpos sejam eles neutralizantes, fixadores do complemento ou inibidores de hemaglutinação.
- Diagnóstico virológico - detecção do vírus ou de antígeno viral por Isolamento do vírus ou

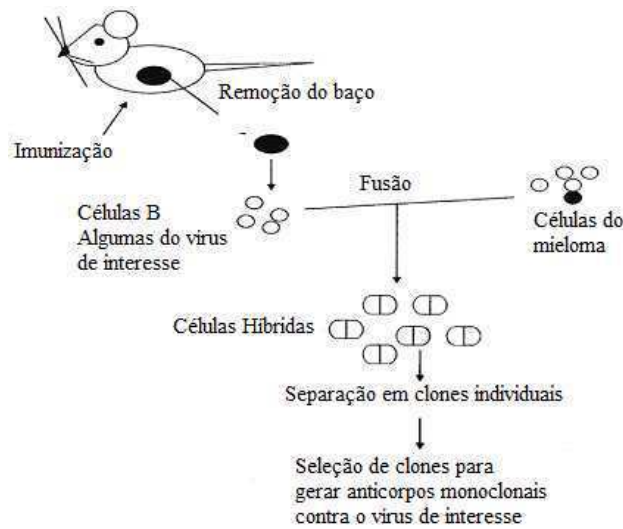


Figura 2.13: Formação de hibridomas e produção de anticorpos monoclonais. Figura adaptada de [87]

de antígeno (e.q.NS1)

- Diagnóstico molecular - detecção do RNA viral por RT-PCR ou PCR em tempo real.

2.5.5 Características do vírus dengue

Vírus são microrganismos que se replicam sempre dentro de células vivas; utilizam o sistema de síntese das células, e induzem a síntese de proteínas capazes de transferir o genoma viral para outras células [66], [56].

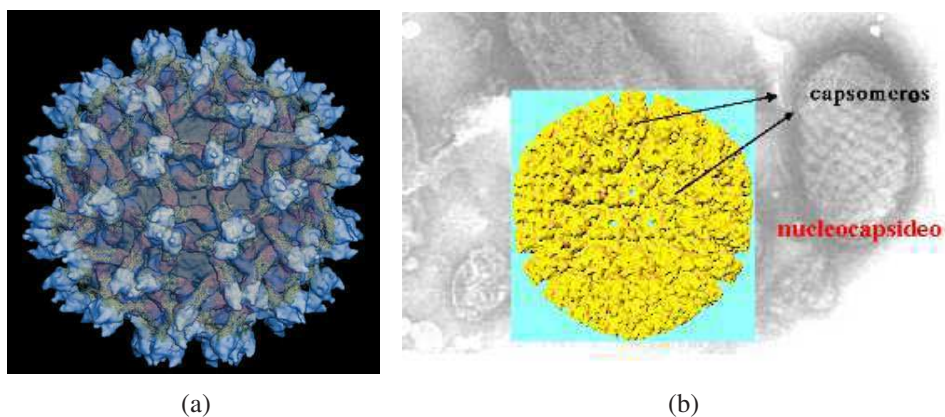


Figura 2.14: a) Vírus dengue (DENV) b) Ilustração da estrutura de um vírus. No realce o nucleocapsídeo formado por capsômeros. Figura adaptada de [15]

A estrutura dos vírus, ilustrada na Figura 2.14b, é em geral composta por:

- Genoma ou núcleo: RNA ou DNA.
- Capsídeo (formado por capsômeros).
- Envelope (glicoproteínas - peplômeros).

A cobertura protéica ou capsídeo de um vírion (vírus completo ou partícula vírica) é composta de cópias múltiplas de um, ou mais, tipos de proteínas. Essas proteínas se associam entre si, formando unidades estruturais denominadas capsômeros. O conjunto do genoma mais o capsídeo é denominado nucleocapsídeo. Os vírus envelopados contêm uma membrana externa que recobre o nucleocapsídeo (Figura 2.14b). Essa membrana externa (ou envelope) é derivada de membranas da célula hospedeira. A classificação dos vírus é feita por agrupamento de vírus com características comuns. O vírus dengue tem a seguinte classificação, conforme [17], mostrada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Classificação dos vírus dengue

Família	<i>Flaviviridae</i>
Simetria do capsídeo e diâmetro (vírion)	Icosaédrica 40-60
Gênero	Flavivirus
Espécie	Vírus dengue
Tipos (oficiais)	1,2,3,4

2.6 Imunoensaios

A detecção de anticorpos, ou de antígenos, é empregada no diagnóstico de doenças, e isso é muitas vezes um processo demorado que requer a avaliação dos níveis de anticorpos na fase aguda e convalescente da doença. A detecção e avaliação desses anticorpos, os quais refletem o estado da doença, são utilizados para o planejamento de programas sanitários e em estudos epidemiológicos de surtos. Uma medida mais rápida é utilizar anticorpos específicos (soro hiperimune) para detectar os antígenos virais diretamente das amostras clínicas. Esses anticorpos podem ser obtidos através da hiperimunização de coelhos, cabras ou camudongos com vírus. Outra alternativa que pode ser empregada é utilizar anticorpos monoclonais. O imunoensaio é o método de diagnóstico que utiliza a capacidade de um anticorpo ligar-se química e especificamente a uma única molécula ou um grupo muito limitado de moléculas, que é denominada de antígeno. Em um imunoensaio,

a ligação antígeno-anticorpo, altamente específica e sensível, é utilizada para a detecção de proteínas, vírus, bactérias entre outras substâncias que estão presentes em uma amostra fluídica, que pode ser sangue, saliva, solução aquosa, entre outras. A alta sensibilidade dos imunoenaios resultam dos valores das constantes de afinidade [87] nas reações antígeno-anticorpo, que indicam a grande força de atração entre eles. Para realização do imunoensaio, o anticorpo (ou antígeno do vírus, bactéria, etc.) é imobilizado e o antígeno (ou o anticorpo) a ser detectado é imerso ou entra em contato, e uma ligação não covalente ocorre. Para identificação e quantificação da substância em análise (analito), normalmente é associado um marcador fosforescente, luminescente, radioativo, enzimático, molecular e nanoparticular, que se liga a um substrato e geralmente uma mudança físico-química é observada, como a alteração da cor. Utilizando esse procedimento, a presença ou não do analito e a quantidade (massa ou concentração) da mesma pode ser medida [79], [80], [92].

A principal etapa na realização de um imunoensaio corresponde à funcionalização da superfície, na qual sobre uma superfície, plástica ou vítrea, os anticorpos (ou antígenos) de detecção ou captura são imobilizados. Tal funcionalização envolve, normalmente, etapas anteriores de limpeza da superfície e retirada de excesso de material de captura. Isso se realiza usando processos de lavagem, de forma alternada, com soluções aquosas adequadas à determinada aplicação. Os imunoenaios desenvolvidos com marcadores são do tipo sanduiche quando aplicados à detecção de moléculas de grande peso molecular (proteínas, células) ou do tipo competitivo para baixo peso molecular, como herbicidas ou toxinas. Sob o ponto de vista analítico, a formação do complexo imunológico pode ser monitorada pelo método direto, ou seja, sem qualquer marcador, porém, grande parte dos imunoenaios lança mão de marcadores (método indireto). Tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser marcados. Quanto à fase do complexo, de acordo com [93], os imunossensaios podem ser chamados de homogêneos, quando o complexo antígeno-anticorpo (AB-Ag) é detectado sem separação, e heterogêneos quando baseados na separação, imobilizando um dos reagentes. Os dispositivos que realizam imunoenaios, os imunossensores, fazem uso da sensibilidade e especificidade da interação anticorpo-antígeno ou seja, são baseados na reação imunológica, e, na maioria das vezes, o antígeno (ou anticorpo), é imobilizado na superfície de detecção do transdutor. Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado [93]. Os imunossensores têm sido explorados como métodos semi-quantitativos ou quantitativos de detecção analítica. São dispositivos que contém uma bio-

molécula de detecção, que pode converter um sinal biológico em um sinal eletroquímico ou óptico [94]. Estes sinais de respostas dependem das características de ligação entre as biomoléculas imobilizadas. O AB (ou Ag) imobilizado pode interagir de forma a alterar propriedades do transdutor, incluindo sua capacitância, resistência elétrica, índice de refração ou constante dielétrica, etc. A variedade de tipos de imunossensores advém das vantagens de cada um para diferentes tipos de analitos e amostras. Os primeiros imunossensores empregavam marcadores radioativos, mas a restrição quanto ao emprego de radioisótopos conduziu ao desenvolvimento de ensaios com compostos fluorescentes ou enzimas, sendo que o ELISA tem sido o mais amplamente utilizado em análises clínicas e biológicas. Além do ELISA um grande número de sistemas imunossensores foi desenvolvido. Os imunossensores fazem uso da alta sensibilidade do sistema detector/transdutor para reduzir o tempo de medição, e ainda contam com a vantagem da possibilidade de regeneração da camada de imobilização para realizar muitas análises com apenas um imunossensor. O sistema de ensaio imunoabsorvente de enzima acoplada - ELISA- utiliza enzimas que possuam substratos cromogênicos (peroxidase, fosfatase alcalina, galactosidade, luciferase e uréase) e o desenvolvimento da reação é medida por espectrofotometria [56].

2.7 Mecanismos de adsorção e interações moleculares

Serão apresentadas aqui considerações sobre os mecanismos de funcionalização de superfícies biossensoras e modelos de adsorção macro-molecular na superfície de metal do biossensor .

2.7.1 Técnicas de imobilização em superfícies sólidas

Anticorpos, células inteiras ou outros materiais biológicos, imobilizados em substratos sólidos, como filmes finos, são componentes essenciais para o projeto e funcionamento de dispositivos utilizados em ensaios. Comumente ensaios são compostos como uma montagem de camadas. Em geral, estas camadas devem ser organizadas em função da cobertura de moléculas na superfície do sensor, homogeneidade, orientação, robustez e estabilidade química. Monocamadas auto-organizadas (*self-assembled monolayers* - SAM) baseadas em tiol são frequentemente empregadas como uma camada inicial. A conexão com um suporte de filme fino de ouro se baseia na interação química entre um átomo de enxofre do grupo funcional S-H com o metal nobre [51],

[60], [61]. Um outro ligante bem conhecido é a molécula de biotina, com composição química $C_{10}H_{16}N_2O_3S$, também chamada de vitamina H ou vitamina do complexo-B [95]. Comumente, o primeiro passo na análise de interação é a imobilização de um dos interagentes (ligante) na superfície do *chip* sensor [96].

A imobilização pode ser permanente na forma de ligações covalentes, ou transitórias por meio de ligações iônicas, por capturas de elétrons. A técnica de imobilização a ser selecionada depende do tipo de ligante (proteína, açúcar, DNA), o analito a ser usado (interagentes pequenos ou grandes) e o objetivo do estudo (especificidade, concentração, afinidade, cinética). Informações sobre o tamanho do ligante, composição aminoácida, estabilidade do pH e sítios possíveis para acoplamento orientado, contribuem para a determinação do método a ser usado. Tamanho e composição aminoácida são normalmente bem conhecidos. Ambos são usados para determinar como e quanto o ligante deve ser imobilizado de modo a se obter um sinal apropriado. A quantidade de ligante a ser imobilizado depende da aplicação. Para medições de especificidade, ou afinidade, praticamente qualquer densidade de ligante pode ser usada, desde que esta gere um sinal detectável. Para medições de concentração é necessária a maior densidade de ligante para estender o limite de transferência de massa. Em um experimento de controle de transferência de massa a ligação vai depender da concentração do analito e não da cinética de ligação entre o ligante e o analito.

Uma escala de afinidade pode ser implementada com *chips* sensores de densidades de baixa à moderada. O fator importante é que o analito deve saturar o ligante dentro de um intervalo de tempo apropriado. Constantes cinéticas são medidas, com a menor densidade que dá bons resultados, sem que haja interferência por fatores secundários tais como transferência de massa ou impedimento estérico. Ligações de moléculas de baixo peso molecular são feitas com *chips* sensores com tão alta densidade, quanto possível, do componente para se obter um sinal apropriado. Na preparação de ligantes, para cada aplicação, é necessário se usar uma técnica de imobilização específica. Algumas técnicas comumente utilizadas [96] são: adicionar um grupo dissulfeto; adicionar um grupo tiol (-SH₂); adicionar um grupo aldeído (-COOH); e adicionar um grupo de biotina [97]. Aspectos importantes que devem ser levados em conta, na funcionalização do ligante, é o impedimento estérico, além de orientação dos anticorpos quando se ligam na superfície. Se a orientação for adequada pode facilitar a ligação dos antígenos (epítomos) aos anticorpos (paratopos).

A ligação de substâncias (biotina, avidina, anticorpos, etc.) para formação da camada de imo-

bilização na interface sólido-líquida do biossensor pode ser implementada por um processo de adsorção.

2.7.2 Modelos de adsorção na superfície de metal de um biossensor

A adsorção é um fenômeno físico-químico em que uma molécula, o adsorbato, interage com a superfície de um adsorvente. O processo de adsorção, em superfícies sólidas, é um importante processo no qual se deseja remover determinadas substâncias de um fluido atendendo a uma variada gama de aplicações como, por exemplo, purificação de óleos, clarificação de glucose, açúcar, gelatinas e elementos corantes, purificação de bebidas alcoólicas e clarificação de vinhos e sucos e na fabricação de medicamentos.

A classificação do processo de adsorção física ou química, fisiossorção ou quimissorção, respectivamente, é feita a partir das forças envolvidas na interação entre o adsorbato e o adsorvente, e pelo valor da energia envolvida no fenômeno. Tanto a adsorção química quanto a adsorção física são processos exotérmicos. Isto porque há uma diminuição da energia livre da superfície no processo de adsorção. Porém, a entropia diminui, já que as partículas que são adsorvidas têm menor liberdade quando se acomodam nos sítios de adsorção. A adsorção física, chamada também de fisiossorção ou adsorção de Van der Waals, ocorre por forças de repulsão e dispersão, e forças eletrostáticas do tipo dipolo induzido. Este tipo de adsorção não é específica, é facilmente reversível, e não altera as propriedades dos materiais, nem do adsorbato e nem do adsorvente. A energia, no caso da fisiossorção, é da ordem de $\Delta H \approx -5$ a -10 kcal/mol². Fenômenos de fisiossorção geralmente formam sistemas de multicamadas. A adsorção química, ou quimissorção, envolve interações químicas, pouco mais fracas do que ligações químicas propriamente ditas, mas leva à formação de um composto químico de superfície ou complexo de adsorção. É um processo bastante específico, já que é necessário que haja uma interação bastante direcionada entre o adsorvente e o adsorbato para que ocorra. Tende a alterar as propriedades das substâncias envolvidas e envolve energias da ordem de $\Delta H \approx 10 - 100$ kcal/mol². O processo químico apresenta a formação de apenas uma camada de adsorbato [98].

No diagrama 2.15 é ilustrada a adsorção de moléculas (etapa 1) e a dessorção (etapa 2), para formar monocamada, ou multicamada, dependendo do tipo de processo de adsorção. A forma das moléculas de proteína de uma mesma espécie é, em geral, a mesma, ou seja são moléculas

uniformes, e esta forma pode ser esférica, ou outra forma qualquer característica da espécie. Na Figura 2.15 estão indicadas moléculas com forma esférica (semelhante às da albumina sérica bovina - BSA).

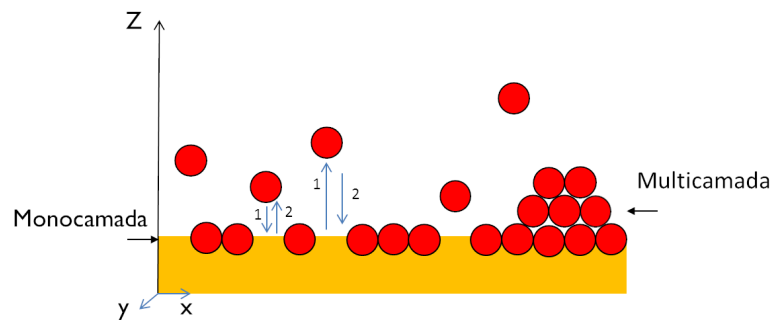


Figura 2.15: Ilustração do processo de adsorção em interface sólido-líquido formando monocamada ou multicamada. Estão indicadas as etapas: 1) ligação da molécula na superfície; 2) dessorção da molécula

Nos métodos imunológicos, um analito é imobilizado na superfície do sensor para detecção do ligante. A construção das camadas de imobilização, em geral, é efetuada por adsorção de substâncias (vitaminas, proteínas) que preparam a superfície para a fixação do analito (anticorpo ou antígeno). O processo de adsorção de proteínas, é um mecanismo complexo, no qual podem ocorrer diferentes modalidades conformacionais por influências da interação de vizinhança entre as moléculas ou forças iônicas e eletrostáticas com a superfície. A forma das moléculas na interação com a superfície pode ser distorcida, assim como o arranjo das moléculas na superfície, podem sofrer mudanças, dependendo das forças de interação entre as moléculas. Na Figura 2.16 é ilustrado um exemplo de etapas de adsorção de proteínas, com formato de haste, na qual a adsorção passa por vários estágios em sequência: a) transporte da proteína na direção da superfície; b) ligação da proteína com o seu eixo maior paralelo à superfície; c) rearranjo devido ao aumento da interação proteína-proteína e da concentração de moléculas de proteína.

São conhecidos vários modelos matemáticos, expressos em equações que servem para quantificar o adsorbato presente no processo, a uma dada temperatura. Estas equações são chamadas isotermas de adsorção. As isotermas de adsorção são curvas obtidas a partir da quantidade de soluto adsorvido em função da concentração deste soluto. Na Figura 2.17 é mostrado um exemplo de isoterma de Langmuir.

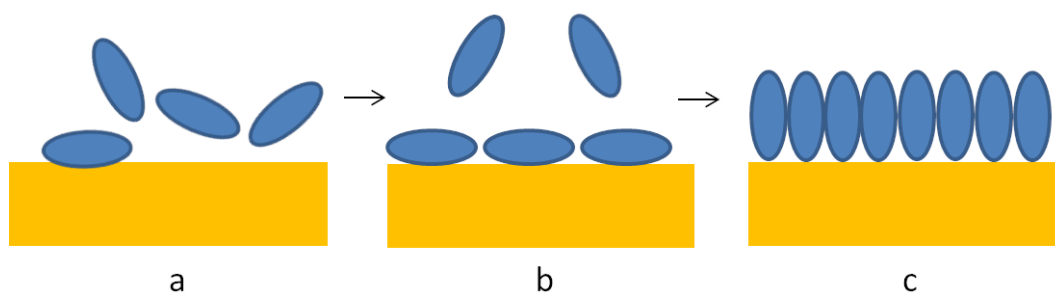


Figura 2.16: Ilustração de um exemplo de etapas de adsorção de proteínas: a) transporte de proteínas para a superfície b) ligação com o eixo maior paralelo à superfície c) rearranjo com aumento da interação e concentração de proteínas.

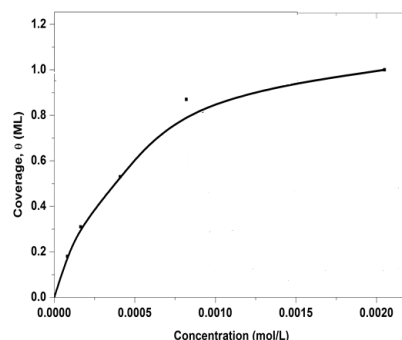


Figura 2.17: Exemplo de isoterma de Langmuir.

Existem vários tipos de isotermas, sendo que cada uma delas se aplica a um determinado tipo de adsorção. Algumas das isotermas mais comuns são a isoterma de Freundlich, a isoterma de Langmuir e a isoterma BET [98]. A isoterma de Langmuir fornece uma descrição mais adequada do processo de adsorção em monocamada e representa simplificada o processo de adsorção como uma reação química entre o adsorvente e o adsorbato [98]. A cinética e a termodinâmica de adsorção podem ser analisadas através de modelos matemáticos que pretendem expressar o comportamento da interação entre as moléculas. Modelos atuais de ligação irreversível macromolecular, na interface da solução com o metal, têm sido explorados e relacionados com observações experimentais. Diferentes conceitos teóricos estão ligados ao processo de adsorção irreversível tais como: Modelo de Langmuir, Cinética Molecular e Modelo de Adsorção Irreversível Sequencial Aleatória [99], [100], [101]. O modelo de Adsorção Cinética Molecular aplica-se de preferência aos casos de misturas de proteínas, como, por exemplo, soro humano. A teoria cinética utiliza uma equação de difusão generalizada em que a força motriz para o movimento molecular

é o gradiente dos potenciais químicos das proteínas. Sua longa abordagem teórica, não descrita aqui, é baseada essencialmente em minimizar a energia livre de superfície. Para esse método, um claro máximo inicial é definido, seguido por uma diminuição exponencial. É praticamente idêntico ao modelo de Langmuir, embora os fundamentos físicos de ambos os modelos sejam bem diferentes.

Em um sistema microfluídico a admissão da solução de proteínas é feita por fluxo contínuo na direção do comprimento da célula e a altura da célula é medida na direção perpendicular à superfície sólida. A Figura 2.18 é uma representação da célula microfluídica contendo solução de proteínas de forma esférica em contato com a superfície na qual estão indicadas a direção X do fluxo, a direção Z vertical e perpendicular à superfície na qual é medida a altura da célula, e a direção Y na qual se mede a largura da célula.

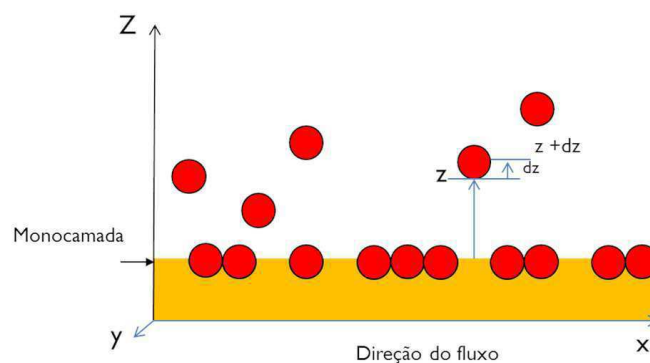


Figura 2.18: Ilustração de uma célula microfluídica com fluxo de solução de proteínas em contato com a superfície. A direção Z é definida perpendicular à superfície e sendo X a direção do fluxo na célula microfluídica.

Modelo de adsorção de Langmuir

A curva isotérmica (ou isoterma) de Langmuir foi desenvolvida em 1916, por Irving Langmuir, para descrever a dependência do recobrimento da superfície por um gás adsorvido sob pressão do gás acima da superfície a uma dada temperatura [102]. O número de sítios ocupados na superfície pela molécula adsorvida no equilíbrio, em uma determinada temperatura, T , dependerá da pressão, P , do gás. Quando considerando isotermas de adsorção é convencional adotar uma definição da cobertura da superfície, θ , o qual define que o máximo de saturação da cobertura da superfície de um adsorbato particular em uma dada superfície é igual a unidade, $\theta_{max} = 1$. A dependência

da taxa de cobertura/ocupação, θ , com a pressão, a uma determinada temperatura, é denominada de isoterma de adsorção. O θ é a razão entre o número de sítios da superfície, ocupados pelo adsorvato, e o número total de sítios de adsorção do substrato. Quando θ atinge o valor 1, então diz-se que foi formada uma monocamada. Em valores muito baixos de pressão, todas as curvas isotérmicas de adsorção têm um comportamento linear para o qual pode-se usar a expressão da lei de Henry, na qual a pressão é proporcional à cobertura θ . A curva isotérmica de Langmuir tem sido utilizada, com sucesso, para interpretar o comportamento da adsorção no equilíbrio, de vários sistemas, e para determinar a área de superfície total de um sólido. É particularmente interessante para sólidos com grande área superficial, os quais, em geral, são usados como catalisadores. A isoterma de Langmuir está restrita a apenas uma monocamada de espessura. Esse modelo requer algumas aproximações:

- Considerar que a superfície do sólido é uniforme e contém um número de sítios equivalentes, cada qual pode ser ocupado por uma única molécula do adsorvato.
- O equilíbrio dinâmico existe entre o gás, a pressão P , e a camada de adsorção a uma determinada temperatura.
- Moléculas de adsorvato de uma fase gasosa estão continuamente colidindo com a superfície. Se o impacto ocorrer em um sítio de adsorção livre então haverá formação de uma ligação. Se o impacto for com um sítio ocupado então as moléculas serão refletidas de volta para a fase gasosa.
- Uma vez adsorvida, a molécula estará localizada, ou seja, a barreira de ativação para migrar para um sítio adjacente é maior que kT ; e a entalpia de adsorção por sítio permanece constante independente da cobertura.

Experimentalmente, as medidas nesses sistemas são feitas em termos de quantidade de substância adsorvida por grama do sólido, com a finalidade de se obter as chamadas curvas isotérmicas de adsorção. Essas curvas são gráficos onde estão representados N número de moles de substância adsorvida por grama de sólido versus C , concentração de soluto em equilíbrio, ou P , pressão do gás sobre o sólido. Considera-se que o processo de adsorção do gás A , sobre uma superfície, pode ser representada pela expressão:



na qual S é a posição vazia na superfície do sólido (sítio ativo) e AS representa a molécula adsorvida. k_a é a constante de adsorção e k_d a constante de dessorção. A constante de equilíbrio K_{eq} pode ser escrita como:

$$K_{eq} = \frac{X_{AS}}{X_S P}, \quad (2.37)$$

na qual: X_{AS} é a fração das posições na superfície que estão ocupadas; X_S é a fração das posições livres; e P é a pressão do gás. Comumente se usa θ em função de X_{AS} , onde θ representa a fração da superfície que está coberta. Assim $(1 - \theta)$ representará a fração da superfície que não está coberta. Pode-se então escrever:

$$K_{eq} = \frac{\theta}{(1 - \theta)P} \quad (2.38)$$

ou seja, $K_{eq}P = \theta/(1 - \theta)$ que é a expressão da Isoterma de Langmuir. Rearranjando, em termos de θ , a equação fica:

$$\theta = \frac{K_{eq}P}{(1 + K_{eq}P)} \quad (2.39)$$

Para o caso de adsorção em solução, a curva isotérmica continua válida, devendo somente substituir P , pressão do gás, por C que é a concentração do soluto na solução. Pode-se escrever ainda que:

$$\theta = \frac{N}{N_m} \quad (2.40)$$

na qual N = número de moles de moléculas adsorvidas por grama de sólido; N_m = número de moles de soluto por grama de sólido necessários para formar uma monocamada sobre a superfície. Então:

$$\frac{N}{N_m} = \frac{K_{eq}C}{(1 + K_{eq}C)} \quad (2.41)$$

e rearranjando-se tem-se:

$$\frac{C}{N} = \left(\frac{1}{K_{eq}N_m} \right) + \frac{C}{N_m} \quad (2.42)$$

que é a forma mais usual da Isoterma de Langmuir. Dessa expressão tem-se que essa curva isotérmica de adsorção de Langmuir representa, de um modo adequado, um processo de adsorção. Então um gráfico $C/N \times C$ deverá resultar numa reta, cujo coeficiente angular será igual a $1/N_m$ e o coeficiente linear será igual a $1/K_{eq}N_m$. Tendo os valores de N_m e conhecendo S , a área ocupada por uma molécula adsorvida na superfície do sólido, então a área específica (em metros quadrados por grama) da superfície do sólido pode ser determinada [102]. A energia livre de adsorção a partir da constante de equilíbrio para uma monocamada é dada por:

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln(K_{eq}) \quad (2.43)$$

Solução exponencial como aproximação do modelo de Adsorção de Langmuir

O modelo de adsorção de Langmuir desenvolvido originalmente com precondições e limitações se aplica apenas a processos de adsorção moleculares reversíveis. Devido à sua simplicidade e conveniência, contudo, é amplamente utilizado também para a descrição de fenômenos de ligações irreversíveis. As equações da referência [99] são aplicadas aos transientes de adsorção e curvas isotérmicas correspondentes que determinam a cobertura de superfície molecular dependente da concentração, $\theta(C)$, sob condições de equilíbrio. O modelo de Langmuir obedece à seguinte equação diferencial para a taxa de crescimento global (2.44):

$$\frac{d\theta}{dt} = k_a C [1 - \theta(t)] - k_d \theta(t) \quad (2.44)$$

É importante lembrar que a equação (2.44) apenas se aplica integralmente se a concentração do soluto acima da superfície de adsorção permanecer constante, ou seja, $dC/dt = 0$. Mais ainda, os gradientes de concentração acima das superfícies são considerados nulos $dC/dz = 0$ e os efeitos de adsorção por difusão são desprezados.

Uma solução exponencial, como uma aproximação do modelo de Langmuir para $\theta(t)$ pode ser dada pela equação (2.45):

$$\theta(t) = \left(\frac{K_{eq}C}{1 + K_{eq}C} \right) (1 - e^{-(k_a C + k_d)t}) \quad (2.45)$$

O termo $(K_{eq}C/(1 + K_{eq}C_s))$ define a Isoterma de Langmuir, a partir da qual pode-se deter-

minar a constante de equilíbrio K_{eq} e identificar o mecanismo de ligação. Esta constante K_{eq} é extraída sob condições estacionárias para um tempo grande, t , e para $K_{eq}C \gg 1$, e a cobertura de equilíbrio θ_{mol} deve corresponder à formação de apenas uma monocamada (ML).

A taxa de crescimento obtida da equação (2.45) decresce exponencialmente com o tempo (2.46):

$$\frac{d\theta}{dt} = B(1 - e^{-(k_a C + k_d)t}) \quad (2.46)$$

com B sendo dado por (2.47):

$$B = \frac{k_a^2 C_s^2 + C(k_a k_d)}{k_a C + k_d} \quad (2.47)$$

Com a condição $k_a \gg k_d$ e valores moderados de C , a evolução temporal da taxa de crescimento $d\theta/dt$ se reduz a (2.48):

$$\frac{d\theta}{dt} = k_a C e^{-(k_a C)t}, \quad (2.48)$$

na qual o valor inicial igual a $d\theta/dt = k_a C$, para $t = 0$, é linearmente proporcional a C e a k_a .

Se a evolução temporal da taxa de crescimento, determinada experimentalmente, estiver de acordo com a equação (2.48) isto irá indicar validade de aplicação do modelo de aproximação de Lagmuir. Esta equação, portanto, permite verificar uma relação de aproximação da derivada da curva do índice de refração, em função do tempo, por uma exponencial decrescente.

Modelo de Adsorção Aleatória Sequencial (RSA)

No caso de um processo de adsorção ideal sequencial aleatória (RSA), onde apenas exclusivamente as partículas irreversivelmente adsorvidas, completamente imóveis, não sobrepostas, e sem interação entre elas, são tratados como discos rígidos 2-D, a cobertura $\theta(t)$ deve aproximar-se do limite de saturação *jamming* $\theta^{(\infty)} = 0,547ML$ sendo esta uma função do tempo dada por (2.49):

$$\theta^{(\infty)} - \theta(t) = t^{-\frac{1}{2}} \quad (2.49)$$

A evolução temporal em uma fase de adsorção, preferencialmente desordenada, foi inicialmente explorada por simulação, usando computação numérica, pelo método Monte Carlo, em

[100], e compreende uma taxa de crescimento que decresce rapidamente:

$$\frac{d\theta}{dt} \approx \frac{1}{2}t^{-\frac{3}{2}} \quad (2.50)$$

Porém, essa expressão não é adequada para pequenos valores de t .

Modelo Generalizado de Adsorção Sequencial Aleatória Irreversível

De acordo com [101], o fluxo de moléculas adsorventes, J_{ad} , que compreende a taxa de crescimento das partículas irreversivelmente ligadas, pode ser definido por uma equação generalizada de Langmuir (2.51):

$$J_{ad} = \frac{d\theta}{dt} = k_a C \phi(\theta(t)) - k_d \theta(t), \quad (2.51)$$

onde $\phi(\theta)$ é definida como a Função de Superfície Disponível (FSD). Para o modelo de adsorção de Langmuir a FSD é dada por (2.52):

$$\phi(\theta) = 1 - \frac{\theta}{\theta_L}, \quad (2.52)$$

que resulta na equação (2.44). θ_L indica a cobertura de saturação, normalmente uma monocamada. Em um experimento típico de ligação molecular θ , e, por conseguinte, o fluxo J_{ad} variam com o tempo. Sob condições de adsorção irreversível, dois diferentes casos têm sido considerados:

1. O chamado modelo da referência [100], que se aplica a valores de coberturas de baixa à moderada, com a função de cobertura sendo dada por (2.53):

$$\phi(\theta) = 1 - B_3 \theta_{mol}^3 + D \theta_{mol}^4. \quad (2.53)$$

O termo constante nessa expressão de Taylor implica que pelo menos 3 partículas já adsorvidas e adjacentes são requeridas para evitar adsorção de uma nova partícula.

2. Para o caso de adsorção sequencial aleatória, de acordo com [100], a função de cobertura toma a seguinte forma (2.54):

$$\phi(\theta) = 1 - a_1 \theta + a_2 \theta^2 - a_3 \theta_{mol}^3 + D \theta_{mol}^4 \quad (2.54)$$

O primeiro termo constante é linear, indicando que apenas uma única partícula adsorvida já previne a ligação de uma nova partícula adjacente, porém permite difusão de superfície.

Semelhante à equação (2.51) a FSD é relacionada ao potencial químico μ da partícula adsorvida na superfície (2.55):

$$\mu = \mu_0 + kT \ln(\theta) - kT \ln(\phi(\theta)) \quad (2.55)$$

Contudo, ao contrário do modelo de Langmuir, a influência da difusão é incluída nesse modelo, com a corrente de difusão através da camada de difusão adjacente à superfície de adsorção dada por (2.56):

$$J_D(z) = -D \frac{dp}{dz} + \frac{p}{kT} \frac{dC}{dz} \quad (2.56)$$

na qual D é o coeficiente de difusão molecular, C é igual a $C = -kT \ln \phi(z, \theta)$, p é a concentração da partícula a uma certa distância Z perpendicular à superfície (como indicada pelo eixo Z , na Figura 2.18). De acordo com [101], a taxa de adsorção (generalizada), comparável à equação (2.51), é então expressa como (2.57):

$$J_{ad} = \frac{d\theta}{dt} = k_a p(Z) C \phi(Z, \theta(t)) - k_d \frac{\phi(Z, \theta(t))}{\phi(Z, \theta(t))} p(Z) \quad (2.57)$$

Sob condições de existência de somente adsorção irreversível, $k_d = 0$. De acordo com a [101], k_a pode ser determinada experimentalmente e depende necessariamente da distância Z sobre a qual condições difusionais, quase estacionárias, são estabelecidas. Se Z é grande, em relação ao comprimento da interação entre a partícula já adsorvida e as partículas recentemente adsorvidas, então $\phi(Z, \theta(t)) = 1$. Portanto, o primeiro termo da equação (2.57) permanece constante, desde que a concentração dos adsorventes $p(Z)$, à distancia Z acima da superfície, permaneça constante, ou seja, $d\theta/dt$ constante. .

Formalizando-se, para $t < t_{max}$:

$$\frac{d\theta}{dt} = p_c, \quad (2.58)$$

na qual p_c é uma constante. E para $t > t_{max}$:

$$\frac{d\theta}{dt} = 0. \quad (2.59)$$

De acordo com as relações (2.58) e (2.59), o modelo exibe uma pequena taxa de crescimento inicialmente constante que se anula para tempos grandes.

Curvas da taxa de crescimento da cobertura pelos Modelos Langmuir (L-TAM), RSA (ORSAM), irreversível RSA (IRSAM) e cinética molecular (G-KAM)

A seguir é apresentado um gráfico, na Figura 2.19, com as curvas das derivadas da cobertura correspondentes aos modelos de adsorção: Langmuir (L-TAM), RSA (ORSAM), irreversível RSA (IRSAM) e cinética molecular (G-KAM).

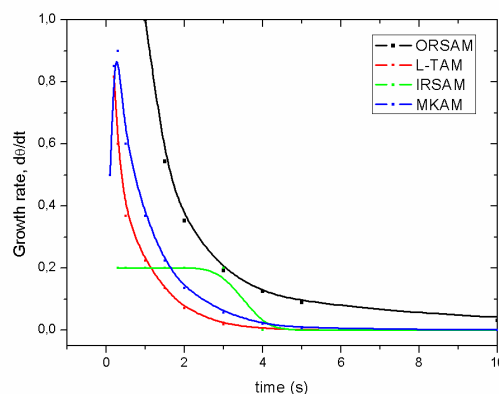


Figura 2.19: Ilustração do crescimento da cobertura pelos Modelos Langmuir (L-TAM), RSA (ORSAM), irreversível RSA (IRSAM) e cinética molecular (G-KAM).

2.8 Considerações finais do capítulo

Neste capítulo foram apresentados os fundamentos teóricos de sistemas microfluídicos, da tecnologia SPR e princípios de imunologia e de imunoenaios, técnicas de imobilização e modelos de adsorção que formam a base para o desenvolvimento de métodos experimentais para análise dos parâmetros de transporte e da cinética e termodinâmica de adsorção. Nos capítulos seguintes, 3 e 4, serão apresentados os métodos experimentais desenvolvidos que constituem as principais contribuições deste trabalho.

Capítulo 3

Análise dos sistemas microfluídicos sem adsorção

Neste capítulo são realizadas análises da resposta transitória do sistema microfluídico e apresentados os novos métodos experimentais desenvolvidos, e que se constituem em contribuições deste trabalho: 1) método experimental para determinação da velocidade de fluxo de escorregamento na parede do canal microfluídico e 2) método experimental para determinação do coeficiente de difusão mútua, D , do analito no solvente.

3.1 Método para determinação das condições de fluxo

Inicialmente será feita uma abordagem dos problemas relacionados à determinação dos perfis de fluxo bem próximo às paredes de um microcanal e em seguida apresentado o método desenvolvido, para análise da resposta transitória e modelagem das condições de fluxo, bem próximo às paredes de um microcanal.

3.1.1 Motivação

Quando fluidos se movem em superfícies sólidas, se estas forem suficientemente rugosas, a condição de não escorregamento (*no-slip*), ou seja, velocidade zero nessa superfície é considerada adequada. Contudo, em escalas muito pequenas, a condição de *no-slip*, comumente se aplica de forma modificada, mas é tratada de modo insuficiente pela teoria convencional. Nessas dimen-

sões medições de perfil de fluxo confiáveis são difíceis de realizar e demandam investigações e estruturas de montagens mais complexas. Para ilustração, a condição de fluxo de não escorregamento está representada na Figura 3.1, onde estão indicados os perfis de velocidade ideal e desvios do perfil parabólico do fluxo hidrodinâmico e, ainda, os parâmetros de comprimento de escorregamento (*slip length*), positivo e negativo.

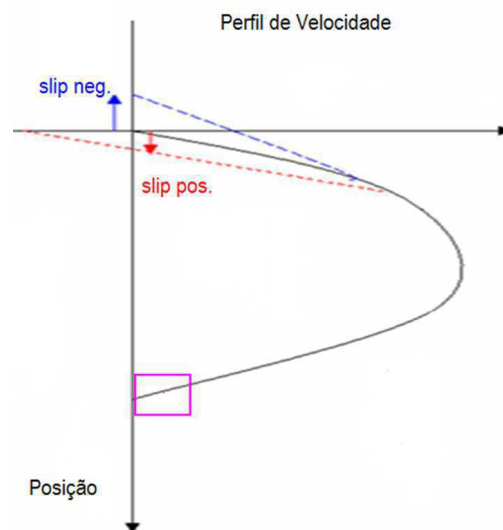


Figura 3.1: Ilustração do perfil de velocidade ideal e comprimentos de escorregamento positivo e negativo.

No século passado o modelo parabólico ideal do perfil de velocidade e de *no-slip*, foram considerados adequados para a maioria dos fluxos macroscópicos. Contudo, com a recente miniaturização para escalas micro e nanométricas e com o avanço das técnicas de diagnóstico, aumentando a capacidade de determinação de interações físicas entre fluido e superfície, essa condição de *no-slip* tem sido reavaliada [7]. Observou-se, em especial, que mudanças na interação fluido-superfície, (tal como a propriedade de as superfícies serem hidrofílicas ou hidrofóbicas), podem afetar a capacidade do fluido de trocar momentum com a superfície, na escala atômica, resultando numa velocidade de escorregamento, na parede do canal, diferente de zero. Em estudos de perfis de velocidade de escorregamento efetuados anteriormente foram determinados comprimentos de escorregamento de 20 nm até 1 μm . Na Figura 3.2 (a) e (b) são mostrados alguns desses resultados de perfis de velocidade medidos com a técnica PIV [10], nas proximidades das paredes do canal, onde podem ser observadas distorções do modelo parabólico ideal.

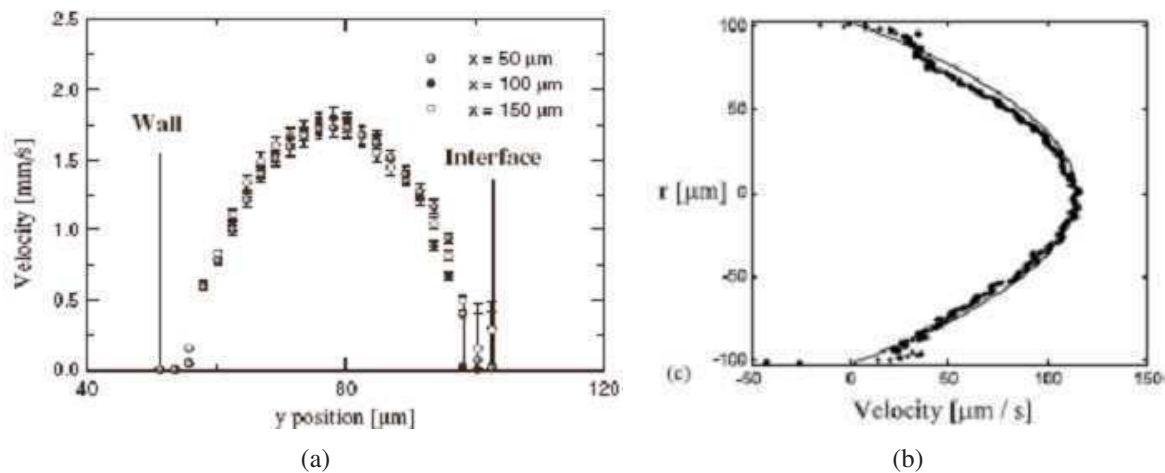


Figura 3.2: (a) e (b) - Perfis de velocidade e desvios medidos com a técnica PIV [9].

Não há, ainda, um completo entendimento acerca da origem dos efeitos de escala e desvios do perfil parabólico do fluxo hidrodinâmico ideal nas proximidades das paredes do canal. A necessidade de uma melhor precisão e confiabilidade na determinação desses e de outros parâmetros de transporte é uma das motivações do presente trabalho. Além do objetivo de desenvolvimento de novos dispositivos há ainda questões de pesquisa não solucionadas, referentes aos processos de transporte; em particular, o movimento de partículas em microdispositivos e o impacto de forças de superfície. Forças superficiais são muito importantes e frequentemente dominantes em escalas muito pequenas que caracterizam os microdispositivos. Essas forças incluem as forças de Van der Waals e a tensão de superfície que é significativa quando interfaces fluido-ar ou fluido-fluido estão presentes [103]. Forças de superfície podem ser manipuladas por padronização de substratos [104], via fluxo laminar, em escalas de comprimento de microns para submicrons. Como foi explicado recentemente [105], micropadronização de superfície das paredes de um microcanal direciona fluxos de fluido com base na molhabilidade e assim mantém contato contínuo entre fluxos de gás e líquido. Padronização de superfície via fluxo laminar em microcanais é também potencialmente muito útil em outros processos de revestimento em microescala [78], e representam uma nova aplicação de planejamento e controle utilizando os princípios microfluídicos. Um melhor entendimento da dinâmica dos microfluidos pode, a princípio, produzir novos, melhores e mais eficientes projetos de dispositivos micro e nanofluídicos. O desenvolvimento de ferramentas para determinação e análise de parâmetros dessa microhidrodinâmica é imprescindível para o projeto e fabricação destes dispositivos. Neste trabalho propõe-se desenvolver um método experimental

para determinação de parâmetros de transporte nas proximidades das paredes internas, em um micro-canal, com alta resolução espacial para uma determinada geometria, utilizando-se a tecnologia de ressonância de plasmon de superfície - SPR. O método é baseado na resposta transitória do fluxo, devido à difusão convectiva, e na ausência de adsorção específica, para extrair informações quantitativas dos parâmetros de transporte, e em especial, velocidade de escorregamento. A determinação de parâmetros de transporte com precisão e confiabilidade é importante nos processos como misturas, reações, separações e manipulação de partículas, em escalas muito menores (que as utilizadas em tecnologias convencionais), onde a velocidade e o comprimento de escorregamento são determinantes. Visa-se, ainda, atender à necessidade de análise dos mecanismos de transporte e aperfeiçoamento das células de fluxo no intuito de, entre outros objetivos, reduzir o volume de fluido e permitir a otimização de parâmetros de desempenho em aplicações críticas como, por exemplo, na determinação de DNA. Para se efetuar as análises e o desenvolvimento do método experimental foi utilizada a plataforma mostrada a seguir.

3.1.2 Plataforma experimental

A plataforma utilizada para realização dos ensaios está representada na Figura 3.3. Com esta se implementa o controle de transporte do fluido (analito) que passa por um transdutor de ressonância de plasmon de superfície (SPR) gerando sinais que são lidos, gravados e pré-processados por um computador (PC ou microcontrolador). A plataforma experimental utilizada, sistema SPR-VIR, por ter um menor tempo de amostragem que o sistema Spreeta, mostrou-se mais adequada para os experimentos de determinação do coeficiente de difusão.

Para efetuar o controle de transporte do fluido é acoplada ao sistema uma bomba peristáltica. Após ser selecionado, o fluido passa em uma célula de fluxo constituída de duas superfícies planas muito próximas, com uma camada sensível em uma das superfícies, gerando sinais detectáveis. O computador (PC ou microcontrolador), através de uma interface, efetua o controle dos dispositivos e a aquisição dos sinais gerados pelo transdutor, e efetua o processamento adequado. A superfície sensível é parte integrante do transdutor de ressonância de plasmon de superfície. O fluido (analito) selecionado, sob pressão da microbomba, passa através da célula de fluxo, onde está acoplada a superfície sensível, que é parte integrante do transdutor. Se ocorrer variação na concentração do analito, nessa superfície sensível, o transdutor gera um sinal elétrico. O microcomputador faz a

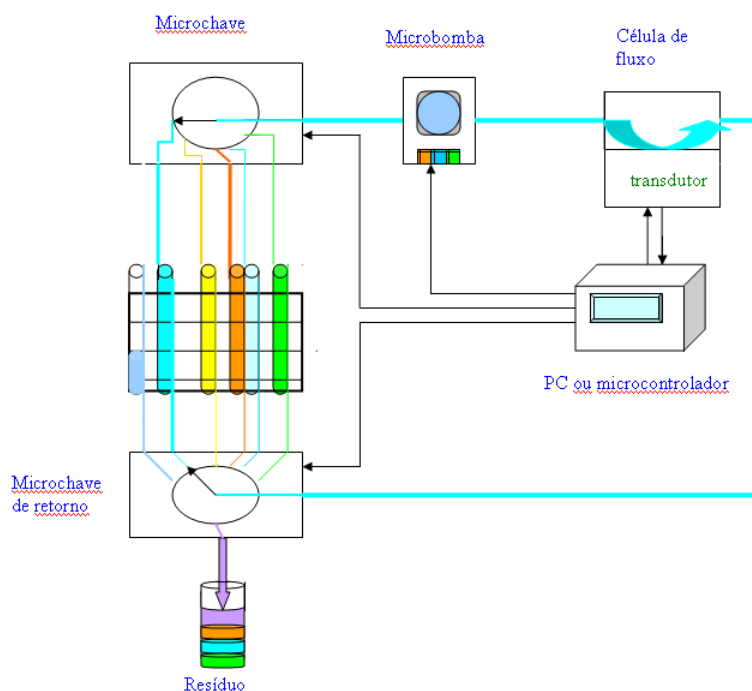


Figura 3.3: Plataforma de ensaio com microchaves, microbomba, célula de fluxo com transdutor acoplado e um microcomputador para processamento e controle.

aquisição dos sinais gerados e controla o fluxo do analito que pode ser descartado ou reaproveitado. A célula microfluídica, utilizada na montagem do experimento, é mostrada na Figura 3.4. O fluxo e os dois diferentes tipos de transporte, difusão e transporte convectivo, da solução, são indicados na figura. O sensor óptico SPR, que detecta mudanças no ângulo de ressonância (modo de interrogação angular), acoplado à micro-célula é mostrado, com o filme semitransparente de ouro e superfície sensível. A camada sensível do sensor SPR é colocada de modo a formar a base inferior do canal. A outra superfície da célula de fluxo é feita de teflon com entrada e saída para o fluxo.

A faixa de medição óptica do sensor SPR no canal de fluxo é indicada na Figura 3.5, através de um corte ampliado da Figura 3.4. Esta corresponde à faixa de decaimento e penetração do campo de onda evanescente na solução, onde as propriedades do fluxo podem ser medidas. Aproximadamente 70% do sinal medido são originados dentro do intervalo de distância de $0,2\mu\text{m}$ da superfície do ouro.

Essa faixa, bem definida, viabiliza alta resolução espacial nas medições com o sensor SPR. A superfície do canal é livre de obstáculos ao fluido microscópicos, os quais poderiam gerar turbulências na região próxima à superfície. Os experimentos foram realizados na temperatura

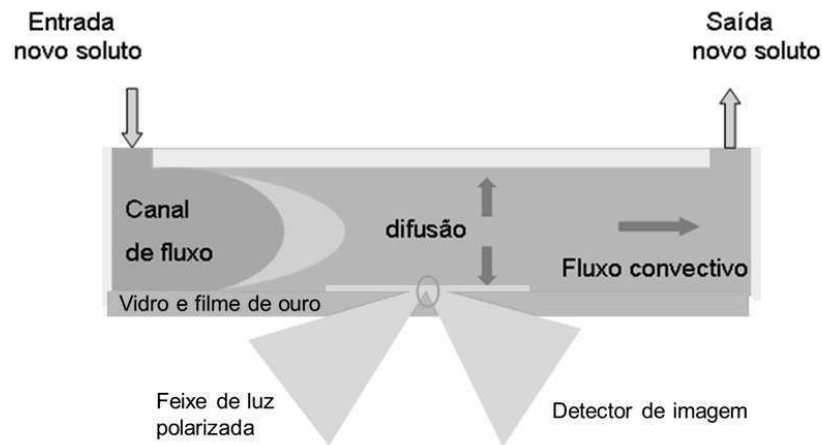


Figura 3.4: Célula microfluídica com sensor SPR.

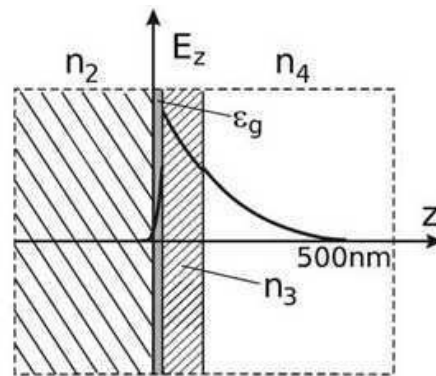


Figura 3.5: Faixa de penetração do campo evanescente.

ambiente (25C) usando o kit SPR da Spreeta, com a célula de fluxo acoplada [106]. No instrumento Spreeta a fonte de luz (leds) com polarizador, o espelho de reflexão e o detector óptico estão integrados em uma só pastilha (*chip*). Devido ao seu projeto robusto e estável, o dispositivo é de fácil manuseio. Com a instrumentação de suporte e condições de operação adequadas, o nível de ruído e de oscilação no sinal do sensor podem ser mantidos em níveis muito baixos ($\sim 10^{-6}$), com uma resolução temporal de 2s. O comprimento da célula de fluxo é de 11 mm, a largura de 1,2 mm e a altura $0,75 \pm 0,05$ mm compreendendo um volume de $10 \mu\text{l}$ com um volume morto de $1 \mu\text{l}$.

As concentrações molares da solução variam de $0,001 < c < 1M$. Soluções para estabilizar o pH não foram utilizadas durante os experimentos, uma vez que estas poderiam modificar a concentração e composição do soluto. A ausência da estabilização do pH requer medições rápidas e soluções recém-preparadas. A solução de NaOH foi escolhida devido ao fato de a variação do

índice de refração com a concentração, $\Delta n/\Delta c$, dos íons OH^- , ser consideravelmente maior do que a dos íons Cl^- das soluções alcalinas, NaCl. Isto viabiliza medições de tempo de resposta precisas e com baixo ruído, para concentrações muito baixas (mM). Uma bomba peristáltica de precisão (Ismatec ISM 832A) foi utilizada nos experimentos. A pequena flutuação da pressão durante a operação de bombeamento não afetou a confiabilidade das medições. Os experimentos requerem uma manipulação cuidadosa e uma limpeza eficiente tanto da superfície de ouro do sensor como dos tubos de Teflon, usados no transporte das substâncias de modo a minimizar os efeitos de oscilação nos sinais mais vagarosos, enquanto mantêm o ruído do sinal de SPR com valores estáveis e adequadamente baixos menores ou iguais a $5 \times 10^{-6} RIU$ (unidades de índice de refração) [107].

3.1.3 Método experimental

O método experimental desenvolvido nesse trabalho para determinação de parâmetros, a partir das equações de fluxo convectivo difusivo (ECD) e de Navier-Stokes (ENS) [19], consiste em acompanhar a evolução, no tempo, da resposta transitória do sensor, até que as condições estacionárias e o equilíbrio químico sejam atingidos, devido à difusão convectiva, e na ausência de adsorção específica. Condições iniciais devem ser definidas para que se possa extrair numericamente o tempo de resposta. Uma função degrau aproximada, da variação temporal de concentração do soluto, deve ser usada como o sinal de entrada do sistema conforme mostrado na Figura 3.6. O sinal de resposta correspondente do sensor de ressonância de plasmon de superfície, que é parte integrante do micro-canal, é tomado como o sinal de saída.

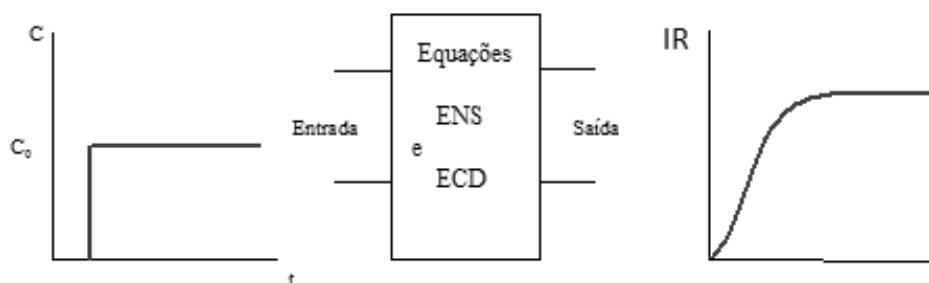


Figura 3.6: Função degrau da concentração do soluto como sinal de entrada e variação temporal do índice de refração como sinal de saída.

Através da variação da concentração do soluto e da velocidade do fluxo/taxa de fluxo, ambos os parâmetros de transporte, convectivo e difusivo, podem ser determinados diretamente. A avaliação da resposta dinâmica do fluxo, $\Delta c \Delta \tau_{tot}$, nos limites assintóticos, pode prover informações das propriedades dos fluxos, difusivo e convectivo, no micro-canal.

Os passos para a execução do método podem ser descritos da seguinte maneira:

- Inicialmente é aplicada uma entrada ao sistema, que é um degrau de variação da concentração do soluto Δc .
- A resposta do sensor, ou seja, o sinal de saída transitório do sensor SPR é gravado até que seja atingido o equilíbrio químico, e corresponde à medida, no tempo, da variação do índice de refração que, por sua vez, é proporcional à concentração da solução.
- Os dados de saída, que definem o tempo de resposta transitório, são gravados em função da taxa de fluxo e da concentração da solução, para uma faixa ampla de valores. Apenas um dos parâmetros concentração ou taxa de fluxo, é mudado, a cada ensaio (enquanto o outro fica constante).
- O tempo de resposta, até serem alcançadas as condições estacionárias, é determinado, para cada valor de concentração do soluto e da taxa de fluxo. A resposta dinâmica $\frac{\Delta c}{\Delta \tau}$, que depende de c , v , D e da temperatura, assim como da geometria do micro-canal, é traçada e por extrapolação, são obtidos os tempos de resposta, difusivo e convectivo, nos limites assintóticos, para $v \rightarrow 0$ e para $c \rightarrow 0$, respectivamente.

O tempo de resposta do fluxo difusivo é determinado da maneira, descrita a seguir. No limite assintótico, para $v(ouf) \rightarrow 0$, para c finito, a ECD, equação (3.1), se transforma na equação de difusão molecular, Lei de difusão de Fick, equação (2.7) (2 Lei de Fick), a partir da qual se pode obter o tempo de resposta devido ao fluxo difusivo, τ_{Diff} , para um sistema unidimensional:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - (v \cdot grad) \cdot c \quad (3.1)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c \quad (3.2)$$

Para ilustrar como é feito o cálculo do tempo de resposta difusivo, τ_{Diff} , na Figura 3.7 é mostrada uma curva, hipotética, da parte dinâmica da ECD, $\Delta c / \Delta \tau_{tot}$, em função da taxa de fluxo. O valor, Δc , é o sinal de entrada conhecido, do degrau de variação da concentração do soluto. Os tempos, $\Delta \tau_{tot}$, são os valores do tempo de resposta transitória do sensor medidos para cada valor da taxa de fluxo f , com os quais os pontos da curva, $\Delta c / \Delta \tau_{tot}$, (com linha contínua), são determinados. A partir desta curva é feita a extrapolação para o limite assintótico, $f \rightarrow 0$, (com linha pontilhada), e obtém-se o valor do ponto M , no limite assintótico. Nesse ponto o fluxo é puramente difusivo, ou seja, $\tau_{tot} = \tau_{Diff}$, e portanto:

$$\frac{\Delta c}{\Delta \tau_{Diff}} = M \quad (3.3)$$

Por essa expressão, então, calcula-se o tempo de resposta difusivo, τ_{Diff} .

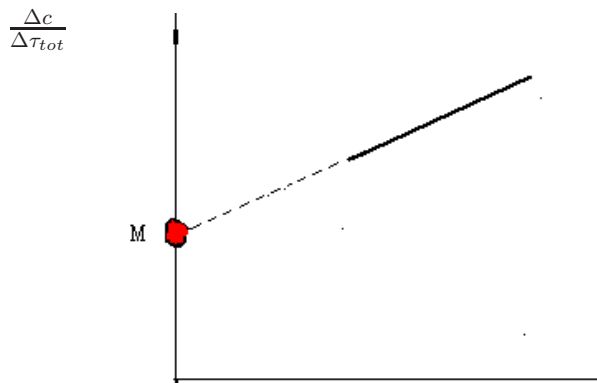


Figura 3.7: Ilustração da determinação do tempo de resposta difusivo, τ_{Diff} , para $f \rightarrow 0$.

A determinação do tempo de resposta para o fluxo convectivo é descrita a seguir. Na ausência do soluto, ou seja, para $D = 0$ e para v finito, a equação ECD se transforma na ENS, substituindo a concentração do soluto c pela densidade do solvente ρ .

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -grad(\rho v) \quad (3.4)$$

O fluxo é então puramente convectivo. O tempo de resposta devido ao fluxo convectivo (τ_{CD}) pode ser, então, determinado pela extrapolação da curva do tempo de resposta, em função da concentração, no ponto $c = 0$.

3.1.4 Descrição dos experimentos

Para a execução dos experimentos são realizadas as seguintes etapas básicas;

1. Após a limpeza adequada (com hipoclorito e hidróxido de sódio) da superfície do sensor, inicialmente água é bombeada através da célula de fluxo e o sinal de saída do sensor é gravado pelo medidor SPR.
2. Em seguida a bomba é desligada, e o fluxo interrompido.
3. É selecionado pela auto-amostrador (ou micro-chave) a solução contendo íons de NaOH e a bomba é religada. Aos poucos o soluto vai substituindo a solução original de água. (foram usadas diferentes concentrações de NaOH e de taxas de fluxo).
4. Após ser atingido o equilíbrio químico, ou seja, o regime estacionário, a bomba é desligada.
5. A entrada é novamente selecionada para fornecer água por um tempo, suficiente para que toda a solução de NaOH tenha sido retirada da célula de fluxo, permitindo que novo ciclo de ensaio possa ser iniciado; e a bomba é religada.
6. Os ensaios são repetidos, no mínimo, nove vezes (número para uma média aceitável) para cada valor diferente de concentração e velocidade do fluxo.

3.1.5 Resultados e discussão

As Figuras 3.8a e 3.8b apresentam a resposta transitória de saída do sensor SPR, que é a variação do índice de refração $\Delta n(t)$ (em valores de Unidades de Índice de Refração - RIU), em função do tempo. São mostradas, como ilustração, o gráfico das variação do índice de refração em (a) para $0.1m$ e em (b) para $0.006m$ de solução de NaOH.

A variação do sinal de saída Δn (RIU) é proporcional à variação do sinal de entrada da concentração, Δc . Observa-se que, no primeiro caso, Figura 3.8a, para um valor maior de concentração, c , a variação da resposta mostra uma única variação muito rápida do tempo de resposta, em torno de $30 - 40s$, atribuída apenas ao fluxo difusivo. No segundo, Figura 3.8b, para uma concentração muito pequena, duas respostas se superpõem, com magnitudes semelhantes, mas com constantes de tempo bem diferentes: uma resposta rápida inicial de aproximadamente $10s$, seguida por uma

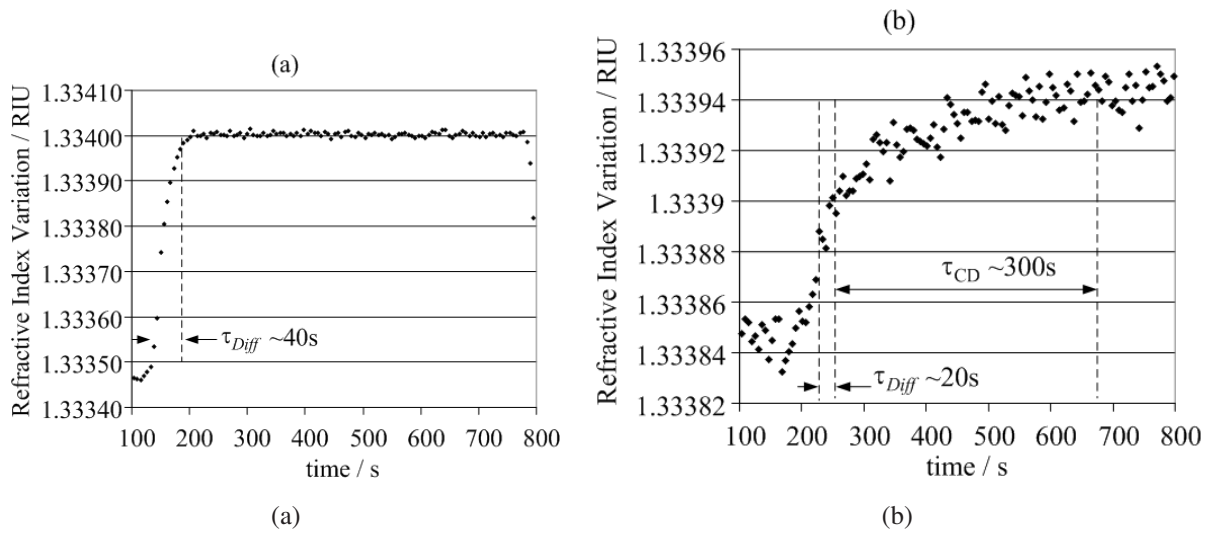


Figura 3.8: Resposta transitória da variação do índice de refração $\Delta n(t)$ bem próximo à parede do canal: a) para solução 0.1 molar de NaOH - apenas um tempo de subida. b) para solução de 0.006 molar de NaOH - dois diferentes tempos de subida.

variação muito mais lenta de até 300s. Na primeira etapa é dominante o fluxo difusivo, e na última predomina o convectivo. Os tempos de subida (10 – 90%) da resposta são indicados nas Figuras 3.8 a e b. A seguir é descrita a determinação do tempo de resposta, $\Delta\tau_{tot}$, da variação do índice de refração, em função da concentração e determinação do tempo de resposta convectivo. Pelo presente método, para se obter o tempo de resposta devido apenas a cada fenômeno de transporte, individualmente, a resposta da célula SPR, como sinal de saída, deve ser determinada:

a) como função das variações de concentração do soluto, Δc , e o valor assintótico, em $c \rightarrow 0$, onde domina o fluxo convectivo.

b) como função da taxa de fluxo, f , e em $f \rightarrow 0$ onde o fluxo difusivo é dominante.

Inicialmente é feita a determinação do tempo de resposta, associado apenas ao fluxo convectivo, τ_{CD} . Na Figura 3.9 é mostrado o tempo de resposta, $\Delta\tau_{tot}$, da solução de NaOH, em função da concentração c , traçado na representação log-log. Os sinais foram medidos com uma taxa de volume de fluxo constante de $444 \frac{\mu l}{min}$. Para comparação, amostras dos gráficos lineares, gravados originalmente, estão incluídos nas janelas, para as soluções de NaOH e também de NaCl.

Cada valor de tempo de resposta, que corresponde a um ponto no gráfico, foi obtido efetuando-se a média de nove resultados medidos. Devido ao nível maior de ruído o desvio padrão calculado, $\sigma = 46s$, é grande para concentrações, do soluto, muito baixas. Contudo a precisão das medições melhora substancialmente para altas concentrações do soluto, com $\sigma = 4,1s$. Deve-se salien-

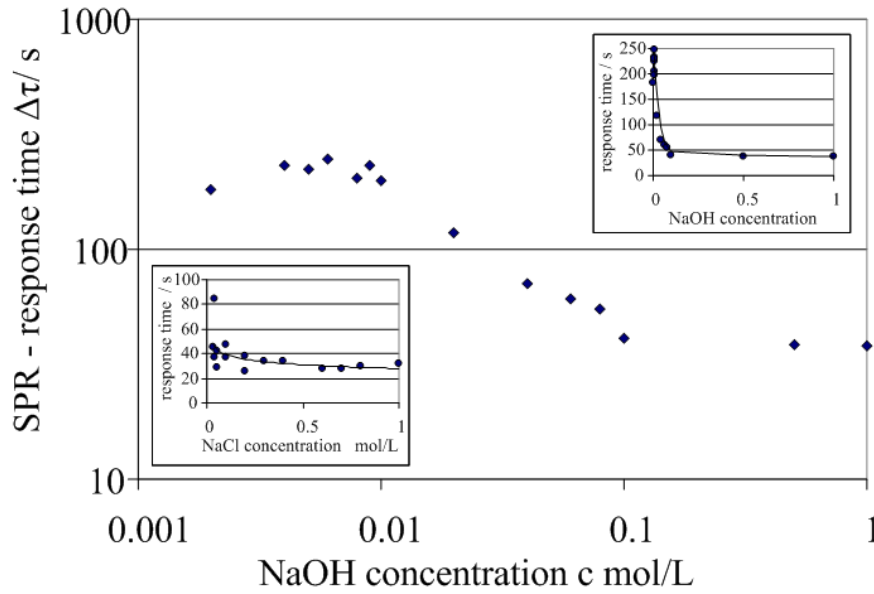


Figura 3.9: Tempo de resposta, transitório, $\Delta\tau_{tot}$, da variação do índice de refração, próximo às paredes, em função da concentração c (log-log).

tar que a solução alcalina apresenta um tempo de resposta um pouco menor que $30s$ para altas concentrações, mas não pode ser medido com boa resolução para valores de baixa concentração. Pode ser observado que há, claramente, três diferentes regiões de fluxo definidas para a solução de NaOH: a região de resposta do sensor SPR constante $\Delta\tau_{tot} = 34 \pm 4, 1s$ para altas concentrações de NaOH, com $c > 0, 1molar$; uma região de transição, com a concentração molar variando como $0, 1 < c < 0, 01$, com um crescimento constante do tempo de resposta; e por fim, uma região estável para concentrações muito pequenas. O limite de detecção molar para as soluções de NaOH foram determinados como $c = 0, 002mol/l$. Em $c < 0, 01$ o tempo de resposta permanece estável em $\Delta\tau_{tot} = 234 \pm 41s$, independentemente da concentração da solução, como indicado no gráfico (Figura 3.9). O tempo de resposta convectivo transitório, obtido na extrapolação, em $c \rightarrow 0$, foi, então, determinado como $\tau_{CD} = 234s$. Na Figura 3.10 são ilustradas a forma e a solução, determinadas experimentalmente, da parte dinâmica da ECD, $\Delta c/\Delta\tau_{tot}$, de acordo com a equação (3.1). As linhas pontilhadas indicam o esperado comportamento assintótico aproximado da função em forma de S . A parte dinâmica $\Delta c/\Delta\tau_{tot}$ é mostrada na representação log-log em função da concentração c da solução de NaOH, a partir dos dados do gráfico da Figura 3.9.

Três diferentes regiões de fluxo foram determinadas, exibindo inclinações diferentes: para altas concentrações, onde valores grandes para $\Delta c/\Delta\tau_{tot}$ persistem, a contribuição difusiva do-

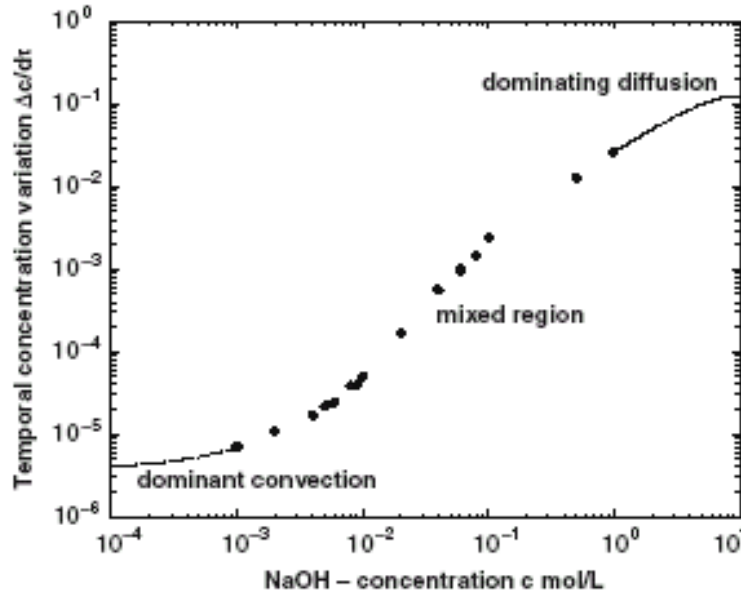


Figura 3.10: Variação e forma da parte dinâmica da ECD; $\frac{\Delta c}{\Delta \tau_{tot}}$ em função da concentração c .

mina, com $D\Delta c > (v \cdot grad) \cdot c$. No intervalo para concentrações muito baixas, um tempo de resposta crescente aponta para um valor muito pequeno $\Delta c / \Delta \tau_{tot} \rightarrow 0$, onde os fluxos difusivos e convectivos estão equilibrados, então $(v \cdot grad) \cdot c \approx D\Delta c$. Esta conclusão é confirmada pelas contribuições de fluxo hidrodinâmico quase idênticas mostradas na evolução do sinal, no tempo, Figura 3.8b. Na região intermediária observa-se uma transição entre ambas as contribuições de fluxo. A determinação da velocidade de *slip*, V_{slip} , a partir da curva da velocidade média V_{HD} , em função de V_u , é feita como se segue (determinada experimentalmente), para um exemplo da taxa de fluxo de $444 \frac{\mu l}{min}$. Considerando o comprimento do canal de $11mm$, e o tempo de resposta do fluxo puramente convectivo, $\tau_{CD} = 234s$, (já obtido por extrapolação, para $c \rightarrow 0$), a velocidade hidrodinâmica (média) de fluxo próxima às paredes do microcanal, é calculada como $V_{HD} = 11/234 = 0,047mm/s$; dentro do intervalo de distância da parede de $0 - 0,5\mu m$, e para a taxa de fluxo de $444\mu l/min$. De maneira análoga, determinam-se experimentalmente, τ_{CD} e V_{HD} , para outros valores de taxa de fluxo. A velocidade do fluxo, próximo à parede, é uma função quadrática da taxa de fluxo aplicada, e da velocidade uniforme de fluxo, associada. Isto é ilustrado na Figura 3.11, onde a curva da velocidade V_{HD} , determinada experimentalmente, é traçada em função da velocidade aplicada V_u , no canal. A velocidade V_u é obtida a partir da taxa de fluxo de volume, levando-se em conta comprimento e volume do canal.

Na curva da Figura 3.11, para um ponto $V_u = 9mm/s(540\mu l/min)$ corresponde uma veloci-

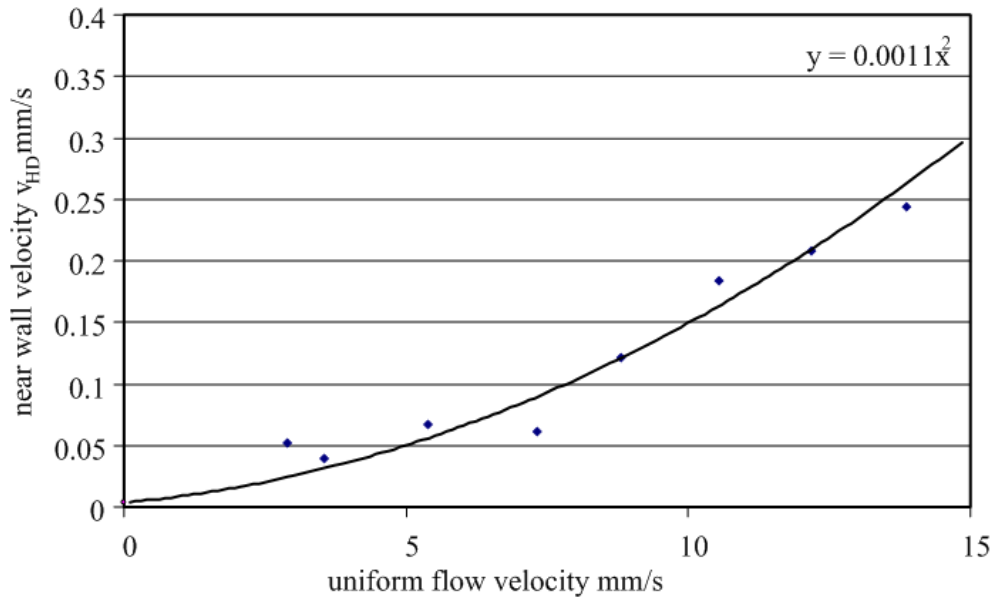


Figura 3.11: Velocidade média do fluxo próximo à superfície, obtida experimentalmente, em função da velocidade uniforme aplicada V_u .

dade média $V_{HD} = 0,12\text{mm/s}$, aproximadamente, para uma distância de penetração do campo de $\delta = 0,5\mu\text{m}$. Para se estimar a velocidade de escorregamento, V_{slip} , traçou-se uma curva, mostrada na Figura 3.12, para a velocidade média próxima à superfície, V_{HD} , considerando-se que o perfil de fluxo segue o modelo de Poiseuille. V_{HD} foi traçada em função da distância ao centro do canal, δ , e passando no ponto $(\delta = 0,5\mu\text{m}; V_{HD} = 0,12\text{mm/s})$, para $V_u = 9\text{mm/s}(540\mu\text{l}/\text{min})$. A velocidade de escorregamento, V_{slip} , e o comprimento de *slip*, δ_{slip} , são estimados, a partir dessa curva.

Para $\delta = 0,35\mu\text{m}$ (na parede do canal) a velocidade do *slip* foi determinada $V_{HD} = V_{slip} = 0,07\text{mm/s}$. Para $V_{HD} = 0$, o δ corresponde ao comprimento de *slip*, $\delta = \delta_{slip} = 0,73\mu\text{m}$ (positivo). Para esta estimativa foi considerado que o perfil de fluxo experimental é também parabólico, e obedece à mesma inclinação, próximo à superfície. Para a velocidade de fluxo uniforme foi encontrado que $V_u < 5\text{mm/s}$ é um valor de corte, abaixo do qual o escorregamento quase que desaparece. Para velocidades de fluxo uniforme, mais elevadas, observa-se que o comprimento de *slip* cresce não linearmente. Esse resultado, $V_{slip} \neq 0$, é uma evidência de que o perfil de velocidade no canal não segue o modelo ideal parabólico. Para se estudar o comportamento do perfil de velocidade, incluindo o *slip*, pode-se fazer uma análise a partir das equações ENS incluindo esta condição, quando necessária, em uma aplicação específica [104]. Um modelamento do fluxo

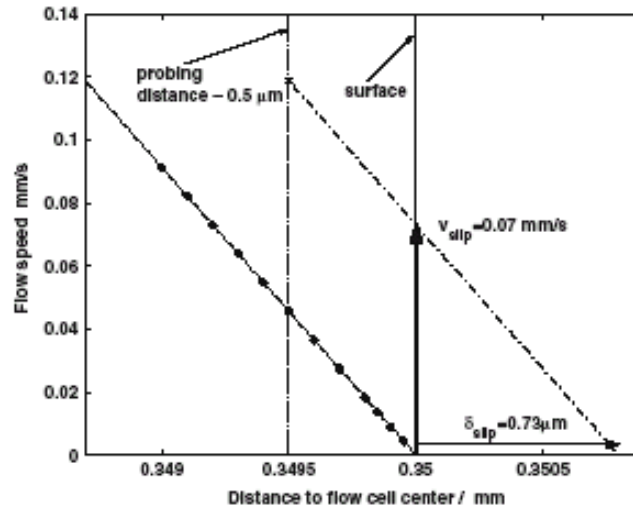


Figura 3.12: Velocidade V_{HD} em função da distância ao centro da célula de fluxo.

incluindo *slip*, através de computação numérica também pode ser feito, visando estudar os efeitos do *slip* em microcanais. Na Figura 3.13 é apresentada a variação do tempo de resposta SPR em função da velocidade de fluxo uniforme aplicada, V_u . Na janela é mostrada essa variação para um perfil de fluxo parabólico ideal.

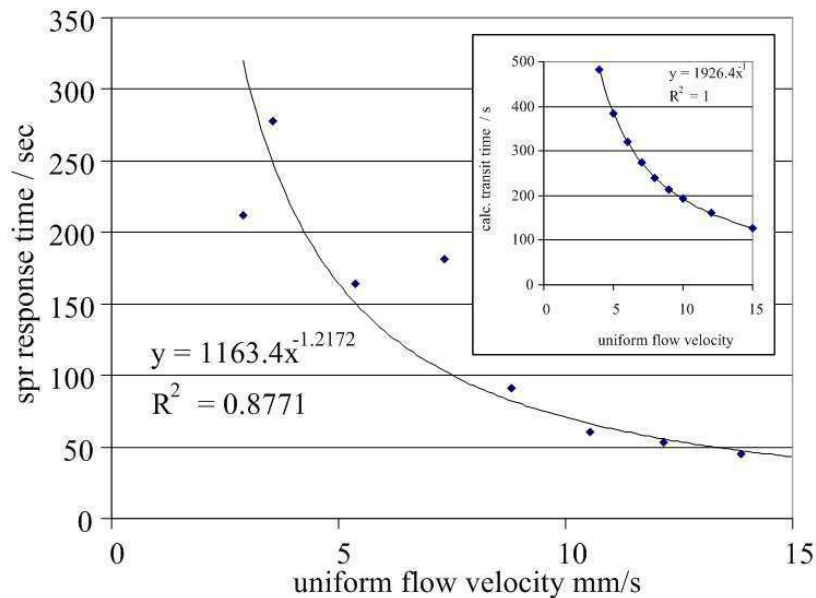


Figura 3.13: Variação do tempo de resposta SPR em função da velocidade de fluxo uniforme aplicada. Na janela é mostrada essa variação para um perfil de fluxo parabólico ideal.

O tempo de resposta convectivo, τ_{tot} , é inversamente proporcional a V_u , seguindo a lei do expoente de potência, como indicado na Figura 3.13. Para comparação, na janela é mostrado

o tempo transitório hidrodinâmico estimado, calculado baseando-se na equação de Poiseuille, para uma distância da parede de $0,5\mu m$. Diferenças distintas existem entre ambos os conjuntos de dados: o tempo de resposta transitório estimado para um perfil simples parabólico ideal é aproximadamente duas vezes maior do que os valores de τ_{tot} determinados experimentalmente. Em outras palavras, o perfil de fluxo parabólico ideal, da velocidade de fluxo próxima à parede, é duas vezes menor, comparativamente à quantidade determinada experimentalmente. Em segundo lugar, o expoente na equação é exatamente -1 para o perfil parabólico, mas foi determinado como um pouco maior (em módulo), sendo $-1,2$ para os dados medidos. Na Figura 3.14, são apresentadas a forma e variação da parte dinâmica da ECD, $\Delta c/\Delta\tau$, em função da taxa de volume de fluxo, obtidas experimentalmente, para a determinação do parâmetro de transporte difusivo. Representa a variação da concentração com o tempo, $\Delta c/\Delta\tau$, para uma concentração no limite mais alto, de $0,1M$ NaOH, e em função da taxa de volume de fluxo.

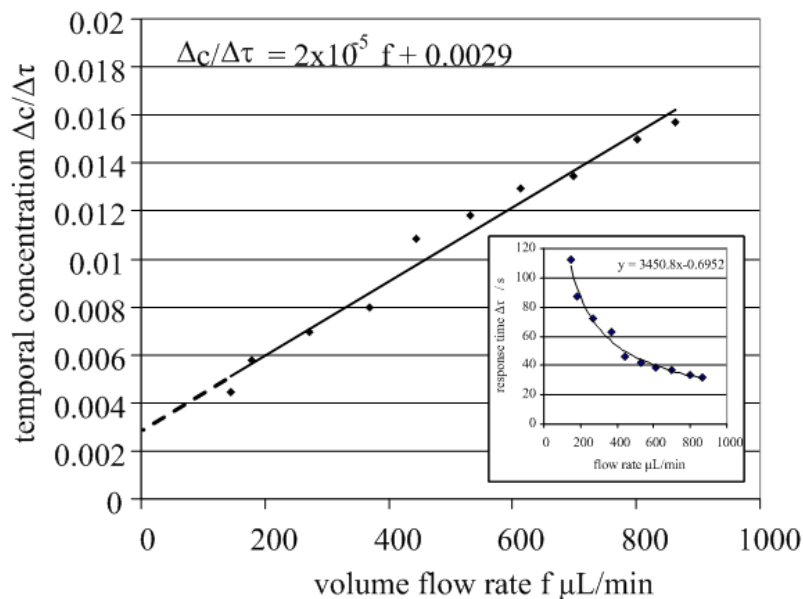


Figura 3.14: Forma e variação da parte dinâmica da CDE, $\frac{\Delta c}{\Delta\tau}$, em função da taxa de volume de fluxo. Na janela é traçado o tempo de resposta (SPR) em função da taxa de fluxo.

Na janela, da Figura 3.14 é mostrado o tempo de resposta (SPR) em função da taxa de fluxo (conjunto de dados original), onde o tempo de resposta aponta um crescimento claramente não-linear para uma taxa de fluxo decrescente, com um expoente associado de -0.69 . A grande diferença em relação ao expoente de $-1,21$ na Figura 3.13, gravados para concentrações muito baixas de solução, mostram os diferentes mecanismos de transporte dominantes. É importante

observar que $\Delta c/\Delta\tau$ é linearmente proporcional a f , estabelecendo, portanto, fácil extrapolação para f tendendo a zero (ou $u \rightarrow 0$), para extrair o valor do tempo transitório difusivo (independente da concentração). De acordo com a solução da equação (3.2), para uma dada geometria, o tempo transitório difusivo, até que o equilíbrio da concentração seja estabelecido, é determinado a partir de $\Delta c/\Delta\tau = 0,0029$, para $\tau_{Diff} = 172,4s$. Considerando a altura do canal de $0,75mm$ e o comprimento de difusão de $0,375mm$, a velocidade de difusão correspondente, através do canal, é calculada como sendo $V_{Diff} = 0,00217mm/s$, independente da taxa de fluxo aplicada. Podem ser feitas as seguintes considerações, como um resumo dos resultados do método:

- O tempo de resposta da célula de SPR, como sinal de saída foi determinado: a) como função das variações de concentração do soluto, Δc , e o valor assintótico, em $c \rightarrow 0$ onde domina o fluxo convectivo, por exemplo: para $f = 444\mu l/min$, $CD = 234s$. b) como função da taxa de fluxo, e em $f(v) \rightarrow 0$, onde o fluxo difusivo é dominante, com o valor assintótico, $\Delta c/\Delta\tau = 0.0029$. Para $\Delta c = 0.5molar$, $\Delta\tau$ foi calculado: $\tau_{Diff} = 172.4s$
- Foram estimados valores do comprimento e velocidade de *slip* na parede do canal: $\delta_{slip} = 0,73\mu m$ e $V_{slip} = 0,07mm/s$.
- Pode-se concluir que a Lei de difusão de Fick pode ser usada, para determinar o coeficiente de difusão, D , como função do τ_{Diff} , obtido experimentalmente.
- Os resultados experimentais obtidos se referem aos parâmetros de transporte críticos, distintos, relativos ao fluxo da solução por difusão e ao fluxo convectivo. Esses resultados confirmam a presença de fluxo convectivo e fluxo de *slip*, na região próxima à parede $d \leq 5\mu m$, sem a presença de uma camada limite. Com esta condição pode-se buscar uma solução da equação ENS incluindo o termo referente ao fluxo de *slip*. Uma modelagem dessa nova condição de fluxo por computação numérica pode ser efetuada [105].

3.2 Método para determinação do coeficiente de difusão mútuo de soluções moleculares

Neste ítem é apresentado o novo método desenvolvido para determinação do coeficiente de difusão mútuo de soluções moleculares, baseado no sensor de ressonância de plasmon de superfície.

Entende-se por difusão o transporte de massas de moléculas individuais por uma barreira ou espaço livre, que ocorre segundo um processo aleatório, e que depende de um gradiente de concentração. Pode ser vista como um processo no qual a concentração tende a se igualar em todos os pontos do sistema com o passar do tempo, ou seja, a diferença de concentração é reduzida através de um fluxo espontâneo da matéria. O movimento Browniano das moléculas garante que o sistema passe de um estado inicial, certamente não em equilíbrio, para um estado final de energia livre mínima e entropia máxima e, portanto, em equilíbrio. A difusão livre ou transporte passivo de uma substância através de um líquido, sólido ou membranas é um processo de considerável importância em processos industriais e em especial na ciência farmacêutica. Exemplos de tópicos de fenômenos de transporte de massa, aplicados à farmácia são: dissolução de fármacos em tabletes, pós, grânulos, liofilização, ultra-filtração, liberação de fármacos de unguentos e de bases de supositórios; passagem de vapor de água, gases, aditivos ou fármacos através dos filmes de revestimentos, cápsulas e paredes de embalagens [108]. Absorção passiva de fármacos pelo próprio organismo ou a distribuição de substâncias nos diferentes compartimentos fisiológicos do nosso corpo. Tais estruturas também compõem a classe dos atuais sistemas de liberação prolongada de fármacos, onde a difusão acontece gradativamente impedindo a ocorrência de elevados picos na concentração plasmática. O processo de difusão é dependente de parâmetros relacionados com o soluto e solvente como a temperatura, pressão e potencial químico. O coeficiente de difusão, D , ou difusividade molecular, é, portanto, um dos parâmetros importantes no mecanismo de transporte de materiais e de relevância para muitos processos físico-químicos e fisiológicos, assim como para a determinação do peso molecular de substâncias [108].

A capacidade de se determinar de forma rápida, e com precisão, coeficientes de difusão é importante, entre outras finalidades, para se estimar e interpretar a qualidade de resultados experimentais obtidos por cromatografia líquida e de eletroforese, em micro-canais. Os coeficientes de difusão fornecem informações importantes sobre organização molecular e estrutura de fases. Porém, a determinação do coeficiente de difusão não é um processo fácil. Para muitos materiais, dados quantitativos confiáveis não estão disponíveis, uma vez que efetuar medições adequadas é uma tarefa tecnicamente complexa de ser implementada. É necessário, portanto, se desenvolver um método para medição do coeficiente de difusão de substâncias moleculares com boa precisão e confiabilidade, de fácil manuseio e de relativo baixo custo. Neste trabalho é proposto um método para a determinação do coeficiente de difusão de substâncias moleculares. A abordagem adotada

aqui é semelhante à utilizada com o sensor-T [109]. O método desenvolvido é livre de marcadores (radioativos ou fluorescentes) e se baseia no monitoramento da evolução dinâmica do índice de refração de uma solução aquosa, enquanto esta é transportada através da célula microfluídica. Neste método utiliza-se um dispositivo microfluídico, de placas paralelas, onde uma das superfícies é parte integrante de um sensor de ressonância de plasmon de superfície, SPR. Na ausência de adsorção, as variações temporais do índice de refração e o tempo de resposta associado, que podem ser determinados experimentalmente, são majoritariamente governados pelos transportes do fluido difusivo na direção transversal da célula e convectivo ao longo do comprimento do canal. O tempo de resposta total do fluxo é dado, aproximadamente, pela soma das duas contribuições. Em condições iniciais experimentais, adequadamente aplicadas, ambos os mecanismos de transporte podem ser claramente separados. Utilizando-se a análise da dinâmica dos microfluidos e da determinação experimental do tempo de resposta do fluxo difusivo, pode-se obter o valor do coeficiente de difusão do soluto, D , com precisão e confiabilidade. Como suporte ao método experimental utiliza-se um modelo, desenvolvido por simulação, através de métodos numéricos.

3.2.1 Método de Detecção

Esse método se baseia na evolução temporal do índice de refração de um analito, que passa através de uma célula microfluídica. Para o desenvolvimento do método foram implementadas duas abordagens distintas, utilizando-se a tecnologia SPR. Inicialmente foi desenvolvido o método de detecção direta, que consiste na medição, em função do tempo, da mudança do índice de refração, devida ao fluxo difusivo dentro da célula de fluxo, usando o sensor SPR. Com as equações NSE, CDE e Leis de Fick, pode-se determinar o Coeficiente de Difusão, D , a partir do tempo de resposta do fluxo difusivo obtido. Com a finalidade de se efetuar uma comparação desse novo método desenvolvido, de detecção direta, com um método já conhecido, é realizada a segunda implementação com o sensor SPR, aplicando-se o método clássico de Dispersão de Taylor, também chamado de método de Taylor-Aris, técnica cromatográfica ou de dispersão. Pela expressão desenvolvida por Taylor é possível se determinar o Coeficiente de Difusão, D , a partir dos parâmetros medidos da função gaussiana de concentração. Vale salientar que, na primeira abordagem, o parâmetro de interesse é o tempo de difusão do soluto, dentro da célula de fluxo, obtido por detecção direta, através da superfície sensível do sensor SPR. Na segunda abordagem, o que se

quer determinar são os parâmetros da função aproximada Gaussiana da concentração do soluto, que se forma ao longo de todo o percurso no tubo, antes de ser detectada pelo sensor SPR, acoplado à célula de fluxo. Nessa segunda abordagem, diferentemente da primeira, os parâmetros, do fenômeno da difusão que ocorre dentro da célula de fluxo, não são levados em conta, isto é, são desprezíveis, em relação aos da função Gaussiana. Na superfície inferior da célula microfluídica, cuja Figura (2.1) foi mostrada no Capítulo 2 neste trabalho, foi acoplada a superfície de ouro que é parte do sensor SPR, e está agora representada na Figura 3.15. Nela também estão indicados os dois tipos de transporte que ocorrem no interior da célula: fluxo convectivo e fluxo difusivo. O fluxo total, J_{TOT} , na célula microfluídica, é a soma dos transportes convectivo (J_{CV}) e difusivo (J_D): $J_{TOT} = J_D + J_{CV}$.

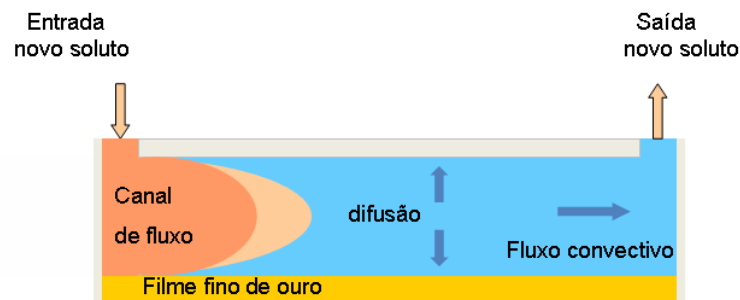


Figura 3.15: Célula microfluídica.

Método de detecção direta usando SPR

Para essa abordagem, de detecção direta, é aplicada uma entrada ao sistema, que é uma função degrau, de concentração do soluto, conforme indicado no diagrama na Figura 3.16. Em seguida, a saída do sensor, que é a mudança do índice de refração, é monitorada até que o equilíbrio químico seja estabelecido, na superfície sensível, dentro da célula. A partir da variação medida do índice de refração é possível se determinar o tempo de resposta transitório devido apenas ao fluxo difusivo, a partir das equações ECD (2.5), ENS (2.9) e Lei de Fick, equação (2.7).

A equação diferencial do fluxo convectivo-difusivo ECD (2.5) obtida a partir da equação da continuidade, já foi mostrada. Rearrmando os termos dessa equação, com a parte dinâmica $\partial c/\partial t$ do lado esquerdo e tomando v como a velocidade, temos a equação (3.5) (já mostrada neste capítulo, item 3.1.3, equação (3.1)):

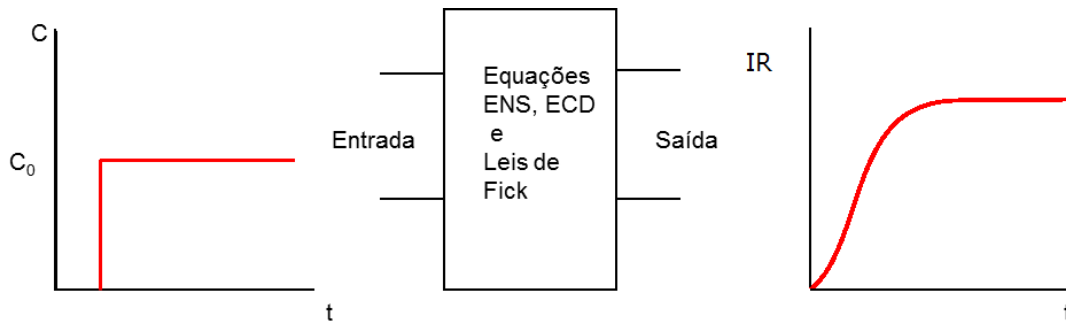


Figura 3.16: Diagrama do sistema com entrada e saída.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c - (v \cdot grad) \cdot c \quad (3.5)$$

onde c - representa a distribuição temporal e espacial da concentração do soluto no solvente; D - é o coeficiente de Difusão; v - perfil de velocidade espacial e temporal da solução. Os termos fonte (dreno e fonte) não estão incluídos uma vez que não há adsorção específica. No limite assintótico, para $v \rightarrow 0$, para c finito, a ECD equação 3.5 se transforma na equação de difusão molecular de Fick equação (3.6) (já mostrada no ítem 3.1.3, equação (3.2)) a partir da qual se pode obter o tempo de resposta (τ_{Diff}) devido apenas ao fluxo difusivo:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c \quad (3.6)$$

Observando-se experimentalmente a evolução da parte dinâmica da equação ECD, $\frac{\partial c}{\partial t}$, pode-se obter o valor do tempo de resposta transitório devido apenas ao fluxo difusivo, τ_{Diff} , da seguinte maneira.

- Inicialmente, com o sensor SPR, através de detecção direta e sem marcadores, pode-se acompanhar a variação do índice de refração, proporcional à concentração da solução e obter o tempo de resposta transitório total (τ_{tot}), devido aos fluxos difusivos e convectivo. O tempo τ_{tot} , é medido, experimentalmente, para vários diferentes valores de taxa de fluxo, conforme indicado na Figura 3.17.
- A seguir faz-se o cálculo dos valores de $\Delta c / \Delta \tau_{tot}$ e plota-se a curva de $\Delta c / \Delta \tau_{tot}$ em função

da taxa de fluxo, tomando-se Δc como o valor constante, conhecido, do degrau de concentração da entrada, ou seja $\Delta c = c_0$.

- Em seguida, no limite assintótico da curva obtida, fazendo-se $f \rightarrow 0$, determina-se o tempo devido apenas ao fluxo difusivo, τ_{Diff} .

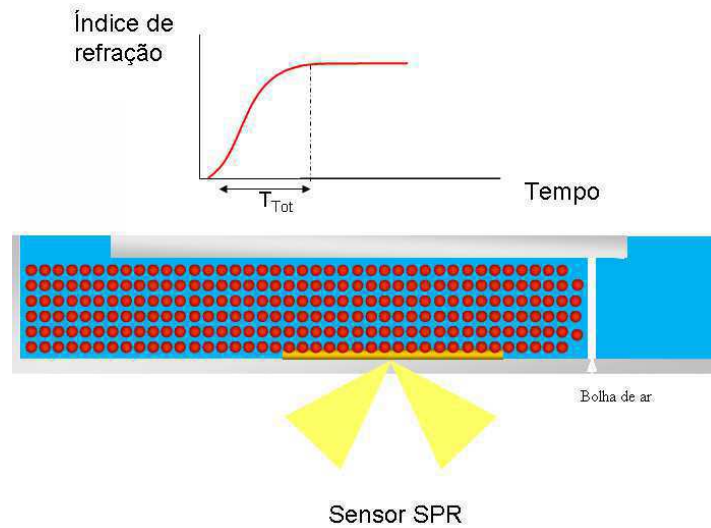


Figura 3.17: Ilustração da célula microfluídica e da resposta na saída do sensor SPR, ao ser aplicado um degrau de concentração do soluto, na célula de fluxo. Uma bolha de ar, indicada pela faixa branca, separa o soluto do solvente.

De forma análoga ao que foi feito no item 3.1 é feito o cálculo do tempo de resposta difusivo, τ_{Diff} . Na Figura (3.18) é mostrada uma curva hipotética, da parte dinâmica da ECD, $\frac{\Delta c}{\Delta \tau_{tot}}$, em função da taxa de fluxo, f .

É importante notar que $\Delta c / \Delta \tau_{tot}$ tem uma relação linear com a taxa de fluxo sendo possível, portanto, uma extrapolação em $f = 0$ (ou $v = 0$), para se extrair o valor do limite assintótico, M , e por conseguinte, do tempo transitório difusivo τ_{Diff} . Quando $f \rightarrow 0$, o tempo transitório é devido, principalmente, ao fluxo difusivo e, portanto, assume-se que, para $f = 0$, $\tau_{Diff} = \tau_{tot}$. De forma semelhante ao método apresentado no item 3.1, o valor de M é extraído da curva por extrapolação. Assim:

$$\frac{\Delta c}{\Delta \tau_{tot}} = M = \frac{c_0}{\tau_{Diff}} \quad (3.7)$$

Por essa expressão, equação 3.7, a partir do valor conhecido do degrau de concentração aplicado na entrada, c_0 , e o valor de M extraído por extrapolação, determina-se o tempo de resposta

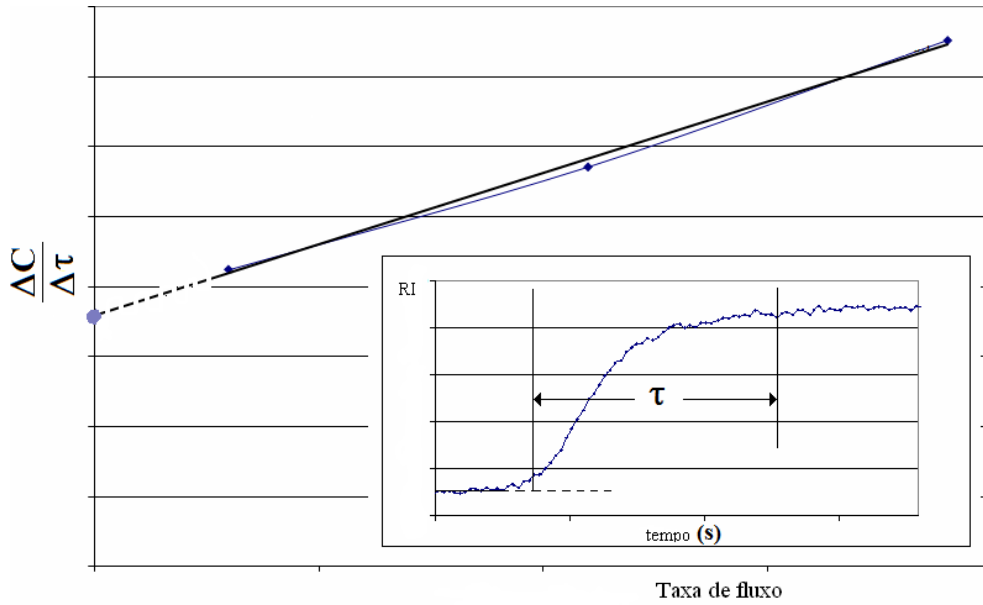


Figura 3.18: Evolução de $\frac{\Delta c}{\Delta \tau_{tot}}$ em função da taxa de fluxo, f . Na janela a variação do índice de refração (RI) em função do tempo, onde $\tau = \tau_{tot}$.

difusivo - τ_{Diff} :

$$\tau_{Diff} = \frac{c_0}{M} \quad (3.8)$$

Conforme visto no item 2.1, a solução conhecida para a concentração do soluto, nas condições ideais de uma geometria unidimensional, é a função de erro complementar erfc:

$$c(x, t) = c_0 \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{L_{Diff}}\right), \quad (3.9)$$

considerando as condições iniciais em $t = 0$ como $c(x, 0) = 0$ e as seguintes condições de contorno, $c(0, t) = c_0$ e $c(\infty, t) = 0$. Foi visto que L_{Diff} é o conhecido parâmetro de distância de difusão (diffusion length), e é dado por:

$$L_{Diff} = 2(D\Delta t)^{\frac{1}{2}}, \quad (3.10)$$

sendo que c_0 é a concentração inicial, D é a difusividade específica do material, x é a distância e Δt é o tempo de difusão τ_{Diff} . Como foi mostrado, para as condições de contorno, e de simetria, a distância, comprimento de difusão, L_{Diff} é, então:

$$L_{Diff} = \frac{H}{2} = 2(D\tau_{Diff})^{\frac{1}{2}} \quad (3.11)$$

Por essa expressão equação (3.10) o coeficiente de difusão, D , pode ser determinado, a partir do tempo τ_{Diff} , como sendo:

$$D = \frac{H^2}{16\tau_{Diff}} \quad (3.12)$$

Método de Dispersão de Taylor

Esta técnica foi desenvolvida a partir dos estudos realizados por Taylor sobre a dispersão de solutos em um fluido em escoamento no interior de um tubo longo e complementados por Aris [32]. É a técnica mais conhecida para determinações de coeficientes de difusão em líquidos. De acordo com esta técnica, uma pequena quantidade de soluto é injetada em um fluido escoando em fluxo laminar por um tubo longo e estreito. Após a injeção, o soluto é disperso por ação de uma combinação de processos devidos à difusão molecular, causada pelo gradiente de concentração, e ao perfil parabólico de velocidades do eluente (solvente), Figura 3.19. Estes processos atuam em oposição: o fluxo laminar distorce o pulso inicial do soluto, tendendo a dispersá-lo; se a difusão molecular é rápida o suficiente, as moléculas do soluto movimentam-se do interior do tubo para a região próxima às paredes, e vice-versa, em um movimento radial que diminui o efeito da dispersão axial. Como consequência, embora pareça paradoxal, solutos com maiores coeficientes de difusão apresentam menor dispersão. O método de Taylor pode ser aplicado tanto para solutos com moléculas menores e, portanto, com maiores coeficientes de difusão como para moléculas maiores.

Após um determinado intervalo de tempo, o perfil axial de concentração no interior do tubo assume uma forma aproximada de uma função Gaussiana, que pode ser acompanhada em um detector. O coeficiente de difusão pode ser obtido a partir dos parâmetros desta curva, utilizando a equação variância Δt_b^2 , que é o parâmetro a ser medido, como expresso no item 2.1, o primeiro termo do lado direito da equação (2.22) pode ser desprezado e a difusividade então é dada pela equação (3.13):

$$D = R_0^2 \frac{t_p}{24\Delta t_b^2} \quad (3.13)$$

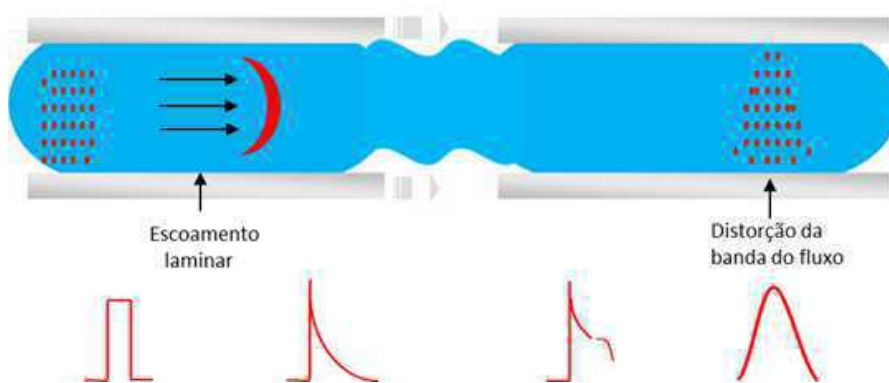


Figura 3.19: Esquema da distorção de um soluto ao longo do tubo em um experimento de Taylor. Na parte inferior da figura são mostrados os modelos de perfis de concentração aproximados em cada estágio do experimento.

Para implementação do método de Dispersão de Taylor, utilizando o sensor SPR, é aplicado, inicialmente, um pulso- δ de concentração do soluto, na entrada de um tubo longo, através do qual esse soluto é transportado, desde o recipiente até a entrada da célula de fluxo, Figura 3.20.

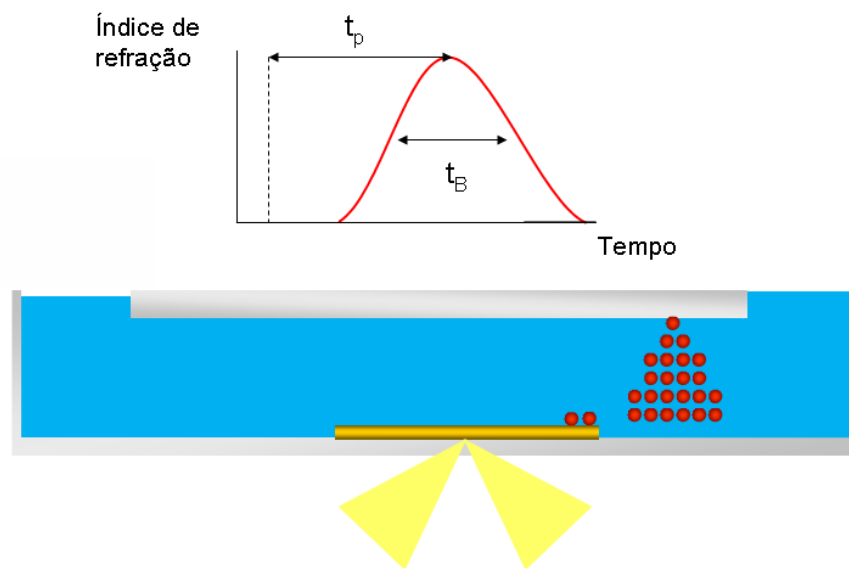


Figura 3.20: O perfil gaussiano da concentração, proporcional ao índice de refração, é detectado pelo sensor SPR acoplado à célula de fluxo.

Sendo o comprimento do tubo suficientemente longo, o perfil da função de concentração, que no início é um δ -pulso, à medida que o pulso se propaga, vai sendo distorcido pelo fenômeno de dispersão, na direção axial, e aos poucos vai se aproximando de uma função gaussiana, conforme ilustrado na Figura 3.19. Esse perfil gaussiano do soluto é, então, detectado, quando chega ao interior da célula de fluxo, pelo sensor SPR. Pela expressão desenvolvida por Taylor, é possível

se determinar o Coeficiente de Difusão (D), a partir dos parâmetros medidos da função gaussiana de concentração detectada. Esta abordagem experimental exige um acompanhamento do tempo de transporte, t_P , em conexão com o alargamento temporal do pulso t_B , de acordo com a equação (3.13). Nessa segunda abordagem, portanto, os parâmetros de interesse são os da função aproximada gaussiana da concentração, detectada pelo sensor SPR, acoplado à célula microfluídica, não se levando em conta o tempo de difusão dentro da célula, considerado desprezível, em relação aos parâmetros medidos, da função gaussiana da concentração. O comprimento do tubo, utilizado nesse caso para o método de dispersão, é relativamente muito grande comparado ao do método de detecção direta. Para solutos que têm coeficientes D muito pequenos, como proteínas globulares de alto peso molecular, o tempo de resposta até alcançar o equilíbrio, é muito alto $\tau_{tot} > 1000s$. Essa faixa excede a faixa de estabilidade do sensor SPR, para o método direto, o qual é muito dependente das pequenas variações de temperatura no ambiente do laboratório, responsável por efeitos de flutuação do sinal. Portanto, o método de Taylor é mais adequado, que o método direto, para a determinação de coeficientes de moléculas maiores.

3.2.2 Montagem e procedimentos experimentais

Um esquema da plataforma do sistema, utilizado nesse método experimental, foi mostrada na Figura 3.3 no item 3.1.2 deste trabalho. Consiste de um sensor de ressonância de plasmon de superfície e de uma célula de fluxo, integrados em um sistema de micro-fluxo. O controle de transporte do fluido (analito), que passa pelo transdutor, é efetuado utilizando-se uma bomba peristáltica e um amostrador automático (ou microchave), controlados por um dispositivo de controle, processamento e armazenamento dos dados (ou computador). Acoplado ao sensor, uma interface faz a aquisição e transmissão dos dados para o computador, onde devem ser realizados análise e processamento. O instrumento SPR utilizado é o sensor SPR Colbi-VIR. Um diagrama esquemático do sistema SPR-VIR, utilizado nas medições, é mostrado na Figura 3.21a e uma foto do instrumento na Figura 3.21b. No sistema SPR-VIR já se encontram incorporados a célula de fluxo, o sensor SPR, a câmera com o sistema óptico de leitura e a interface para aquisição dos dados. Este instrumento VIR está bem descrito em [26].

A queda na intensidade de luz devida à ressonância, medida em função do ângulo, é mostrada na Figura 3.22a onde pode-se ver a imagem gerada pela câmera do instrumento VIR e na Figura

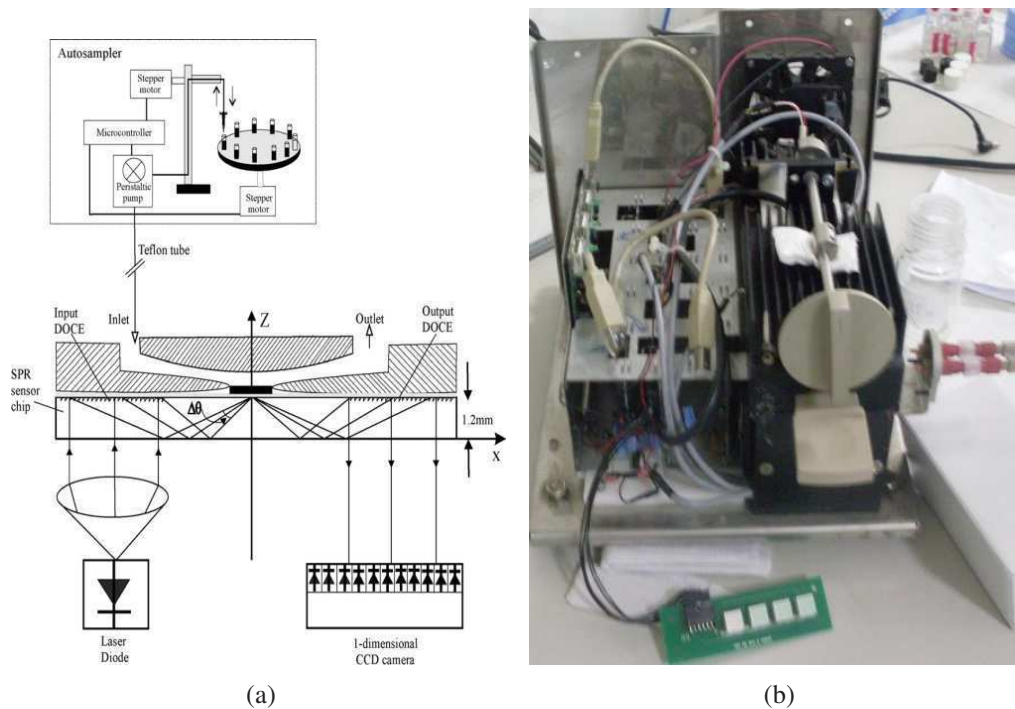


Figura 3.21: Instrumento VIR: a) diagrama do sensor VIR com mostrador automático; b) foto do instrumento VIR.

3.22b a curva SPR da intensidade da luz em função do ângulo (em graus).

A seguir é feito o detalhamento para execução dos experimentos: 1) pelo Método Direto e 2) pelo método de Taylor.

1) Descrição dos passos - Método Direto:

- Inicialmente faz-se circular água deionizada e em seguida é feita a limpeza no sensor fazendo circular hipoclorito de sódio diluído em água.
- Em seguida é aplicada uma entrada ao sistema, que é um degrau de variação da concentração do soluto Δc .
- A resposta do sensor, ou seja, o sinal de saída transitório do sensor, o índice de refração (RI), é gravado até que seja atingido o equilíbrio químico, e corresponde à medida, no tempo, da variação da concentração da solução.
- Os dados de saída, que definem o tempo de resposta, são medidos, para cada valor de taxa de fluxo.

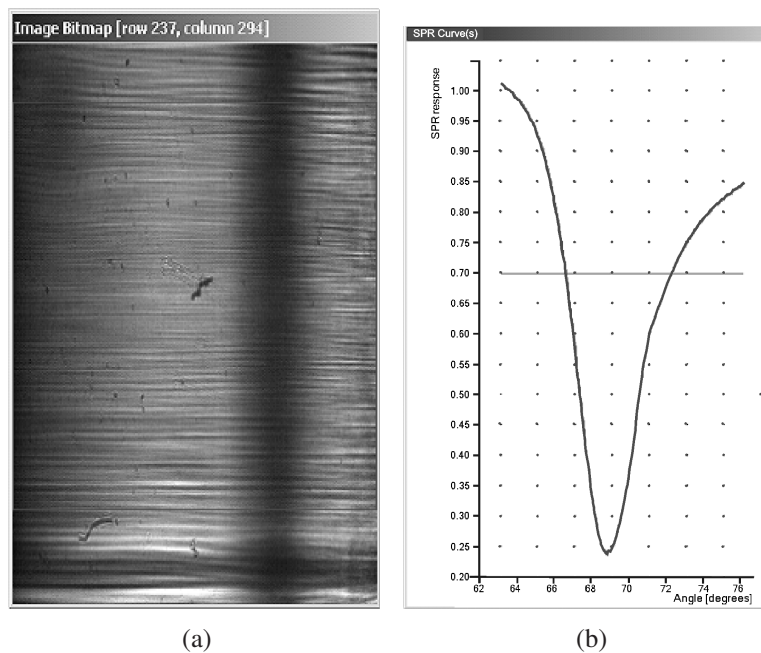


Figura 3.22: a) Imagem da câmera e b) Curva SPR da intensidade da luz em função do ângulo em graus C.

- A resposta dinâmica, $\Delta c/\Delta \tau$, é traçada e por extrapolação, é obtido o tempo de resposta difusivo, no limite assintótico para $v \rightarrow 0$ ($f \rightarrow 0$).
- O Coeficiente de Difusão é então calculado pela equação (3.12): $D = H^2/16\Delta\tau_{Diff}$

2) Descrição dos passos - Método de Taylor:

- Inicialmente faz-se circular água deionizada em todo o percurso do tubo longo e na célula de fluxo e, em seguida, é feita a limpeza no sensor fazendo circular hipoclorito de sódio diluído em água.
- Apenas para os experimentos com proteína (BSA), é aplicado um pulso de 1% (0,4g/l) de solução de proteína (BSA), para que, durante as medições, toda a superfície sensível seja coberta e saturada para não haver adsorção não específica.
- Em seguida é aplicada uma entrada ao sistema, que é um δ -pulso de variação da concentração do soluto Δc .
- A resposta do sensor, ou seja, a variação do índice de refração (RI), que é proporcional à função da concentração, é gravado em função do tempo, até que seja detectado o perfil gaussiano da concentração.

- Os dados de saída, que definem o tempo, t_p , de aplicação do δ -pulso até o instante do pico da função gaussiana, e o valor (t_b) obtido por $FWHM$ (largura à meia altura máxima), são medidos.
- O Coeficiente de Difusão é então calculado pela equação (3.13): $D = R_0^2 t_p / 24 \Delta t_b^2$.

3.2.3 Simulação da hidrodinâmica na célula microfluídica

Para determinação de coeficientes de difusão, a simulação numérica pode ser uma boa alternativa e uma ferramenta bastante útil como apoio aos resultados experimentais, uma vez que não existem valores exatos para coeficientes de difusão para misturas de etanol-água, na literatura. A simulação permite ainda a avaliação da performance dos parâmetros de transporte do modelo hidrodinâmico, podendo ir além dos limites dos experimentos práticos [110]. O comportamento microfluídico da célula de fluxo do dispositivo SPR foi estudado usando simulações com elementos finitos [111] onde o número de Reynolds varia entre 0,4 e 1,0, indicando condições de fluxo laminar. Um modelo acoplado das equações NSE e CDE foi utilizado para o caso tridimensional. As equações de energia foram desprezadas, e nenhuma transferência de calor, entre o fluido e as superfícies sólidas, foi considerada. As forças no corpo do fluido também são desprezadas. As condições de contorno especificadas para as simulações foram as seguintes. Para o modelo ENS a velocidade é $u = 5,0 \frac{mm}{s}$, a saída do fluxo é considerada normal, i.e., $p_{out} = 0$, e a condição de não escorregamento (*no-slip*) é assumida, nas paredes da célula de fluxo. Para o modelo ECD, a entrada refere-se à concentração; a saída é o fluxo convectivo e para diferentes condições de contorno, o fluxo é perpendicular ao contorno, i.e., $n \cdot \Delta c = 0$, onde n é o vetor normal local, no contorno. As condições iniciais são assumidas como $u_i = 0$, $c_i = 0$ e $p_i = 0$, onde todos os nós- i estão no domínio do fluxo computacional. O critério de convergência para os cálculos são baseados em tolerâncias absolutas e relativas. Estas também controlam o erro absoluto em cada passo de integração para ambas as equações. Para a geometria da célula de fluxo, um padrão de malha prismático de 3-dimensões foi utilizado. A malha do tubo tem uma geometria regular e uma menor resolução, enquanto que a célula de fluxo tem uma resolução maior, a qual permite detectar alterações perto da superfície sensível. A resolução espacial dos nós é de $1 \mu m$, próximo à parede celular e aumentada, por um fator de 10, para a região no centro da célula. A malha da célula de fluxo é constituída por 7218 elementos. Ambos os modelos, ENS e ECD, são resolvidos

usando um solucionador não linear transitório onde o perfil de velocidade do fluxo resultante é então utilizado para o cálculo das equações de difusão convectiva. Uma idêntica abordagem foi utilizada para a simulação e quantificação do transporte molecular difusivo através do tubo de admissão de analito, associado com a dispersão do pulso de Taylor.

3.2.4 Resultados

O sensor SPR foi usado nos experimentos para determinação do coeficiente de difusão de uma solução de 5%(v/v) ethanol-água, pelo método direto de detecção. Para comparação a mesma solução foi usada para realização dos experimentos com o método de Taylor, usando SPR. Também foram realizados experimentos com solução BSA, pelo método de Taylor.

Os Resultados pela aplicação dos métodos são descritos a seguir: 1) pelo Método Direto, 2) pelo Método de Taylor e 3) pela simulação.

1- Resultados Pelo Método Direto

Foi aplicada uma entrada de pulso retangular de concentração do soluto de uma solução 5%(v/v) etanol-água, e a saída do sensor, que é o índice de refração, proporcional à concentração, foi gravada, em função do tempo. A variação temporal do índice de refração, proporcional à concentração, medido experimentalmente, para a solução etanol-água, é mostrado na Figura 3.23.

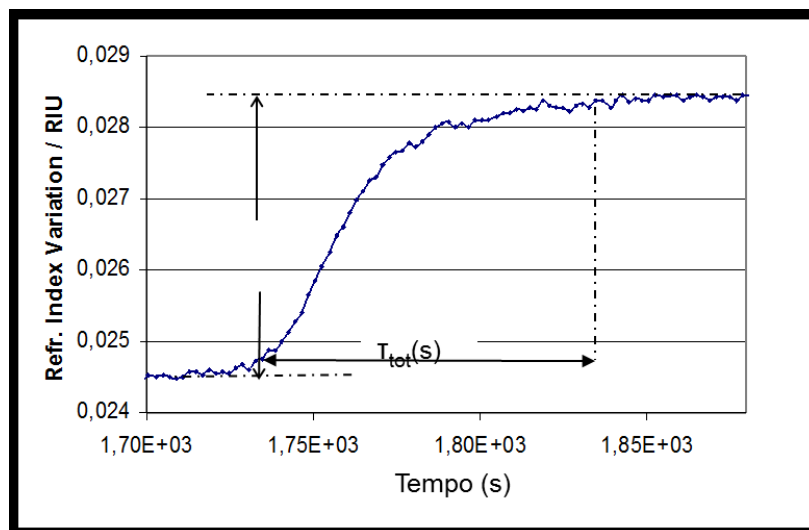


Figura 3.23: Variação do índice de refração medido experimentalmente para a solução 5% etanol-água.

Cada valor do tempo de resposta, τ_{tot} , foi obtido pela média de dez medições, para cada taxa

de fluxo diferente. Utilizou-se uma bolha de ar para separar a água da solução de etanol-água, gerando o pulso retangular, como mostrado na Figura 3.24. Pode-se observar que, sem a bolha para gerar o pulso retangular, o tempo de resposta do sensor é bem maior devido à interdifusão que ocorre durante o transporte no tubo, entre as duas soluções, antes da entrada na célula de fluxo.

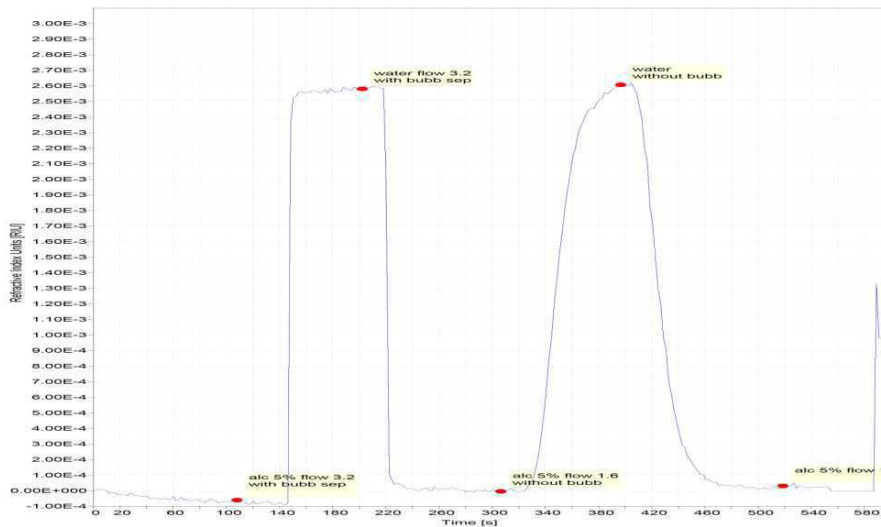


Figura 3.24: Solução de etanol-água medida com Instrumento VIR-SPR.

Os procedimentos e condições para a realização do experimento foram os seguintes:

- Foi utilizada uma solução de 5% (v/v) ethanol-água.
- Taxas de fluxo de 140, 290 e 428 $\mu\text{l}/\text{min}$.
- Um pulso retangular de concentração foi aplicado na entrada $\Delta c = 0.852346\text{mol}/\text{l}$.
- É importante notar que $\Delta c/\tau_{\text{tot}}$ tem uma relação linear com a taxa de fluxo sendo possível, portanto, uma extrapolação em $f = 0$ (ou $v = 0$), para extrair o valor do tempo transitório difusivo τ_{Diff} .
- Altura da célula de fluxo, que corresponde ao comprimento de difusão, L_{Diff} :

$$L_{\text{Diff}} = H/2 = 0.25\text{mm}$$

A tabela com resultados das medições, e dos parâmetros de interesse, é mostrada a seguir, Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Resultados do método de detecção direta com a solução etanol-água.

5%Ethanol-água	Velocidade	Tempo de Resposta	Taxa de fluxo-f	$\Delta c/\Delta\tau_{tot}$
1	1,6	16,25	140	0,05245
2	3,2	12,7	290	0,0671
3	4,8	10,1	428	0,08515

A partir dos dados obtidos (Tabela 3.1) foi plotado o gráfico da parte dinâmica da equação (3.2), $\Delta c/\Delta\tau_{tot}$, determinada experimentalmente, em função das taxas de fluxo, f , utilizadas, mostrado na Figura 3.25.

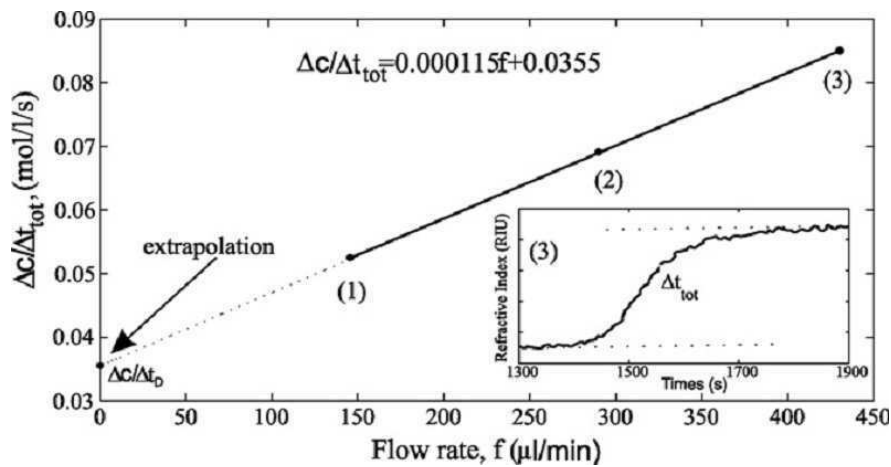


Figura 3.25: Gráfico da resposta dinâmica $\Delta c/\Delta\tau_{tot}$ em função da taxa de fluxo.

Na janela é ilustrada a variação temporal do sinal (RI) da solução, que passa pela célula de fluxo. Inicialmente, uma solução de água circula através da tubulação do sistema e em seguida uma pequena bolha de ar (diâmetro de 1 mm) é gerada para separar essa água da solução de etanol-água. Como já mencionado, esse procedimento gera um perfil de concentração retangular inicial e evita interdifusão das duas soluções durante o transporte do reservatório até a célula de fluxo e permite que se observe a dinâmica difusiva da solução (etanol-água) dentro da célula. O equilíbrio, devido à contribuição de ambos os fluxos, difusivo e convectivo, foi estabelecido após um período de, aproximadamente, 12 segundos.

A variação temporal da concentração em função da taxa de fluxo, f , foi determinada como:

$$\Delta c/\Delta\tau_{tot} = 0,000115f + 0,0355$$

Para a taxa de fluxo igual a zero, no limite assintótico,

$$M = \Delta c/\Delta\tau_{Diff} = 0.0355\text{mol}/(m^3s).$$

Para esse valor de M o tempo difusão ($\Delta\tau_{Diff} = \tau_{Diff}$) é então: $\tau_{Diff} = 24,28s$.

O Coeficiente de Difusão foi determinado, para esse valor de $\tau_{Diff} = 24,28s$, pela equação da Lei de Fick (equação (3.2)) a uma temperatura de $26\text{ }^\circ\text{C}$, como sendo:

$$D = 0.65 \pm 0.1410^{-9}m^2/s$$

A Figura 3.26a mostra mais um resultado da evolução de $\Delta c/\Delta\tau_{tot}$, determinado experimentalmente. A Figura 3.26b ilustra, como exemplo, um resultado de medição do tempo de resposta, τ_{tot} , em função da taxa de fluxo. O desvio padrão, das medidas realizadas com o instrumento VIR, é da ordem de $0,3 \cdot 10^{-6}$ sendo o erro tomado como três vezes o desvio padrão ($0,9 \cdot 10^{-6}$).

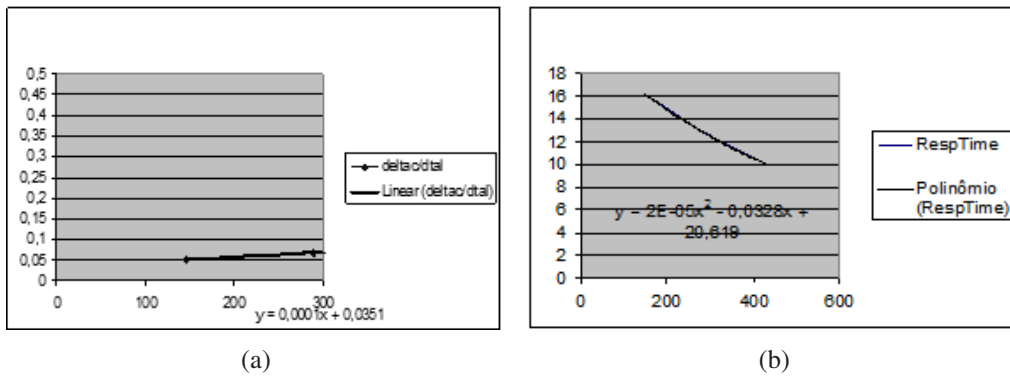


Figura 3.26: a) $\Delta c/\Delta\tau$ em função da taxa de fluxo e b) τ_{tot} em função da taxa de fluxo.

2 - Resultados pelo Método de Dispersão de Taylor

Para comparação, a difusividade para a mesma solução de etanol-água foi determinada, utilizando o Método de Dispersão de Taylor, ilustrado na Figura 3.27. Foi realizado, também, um segundo experimento com a solução aquosa de albumina bovina sérica (BSA). Para esse experimento, após a limpeza com (hipoclorito de sódio), aplica-se uma solução BSA, a 1%, para evitar ligações inespecíficas. Para a realização dos experimentos foram aplicados $\delta - pulsos(3s)$ das soluções, na entrada do tubo de Teflon, com raio interno $R_0 = 3.810^{-4}m$. A resposta do sensor SPR é a variação do índice de refração no tempo, que é a função aproximada Gaussiana da concentração.

O valor (t_b) obtido por $FWHM$ (largura à meia altura máxima), foi $t_b = 81s$, enquanto o tempo de transporte (t_p), através do tubo, foi $t_p = 684s$, como indicado na Figura 3.27 Utilizando-se a equação (3.13) ($D = R_0^2 t_p / 24 \Delta t_b^2$), obtém-se por Taylor:

$$D = (0.625 \pm 0.12)10^{-9}m^2/s$$

Nas Figuras 3.28, 3.29 e 3.30 são mostrados os resultados experimentais obtidos pelo método de dispersão de Taylor para a solução 10%(4g/l) de albumina bovina sérica (BSA)-água.

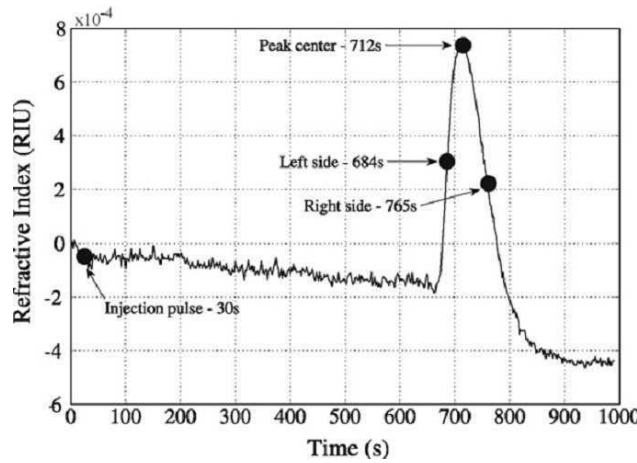


Figura 3.27: Resultados experimentais do Método de Dispersão de Taylor para uma solução de 5% (v/v) de ethanol diluído em água.

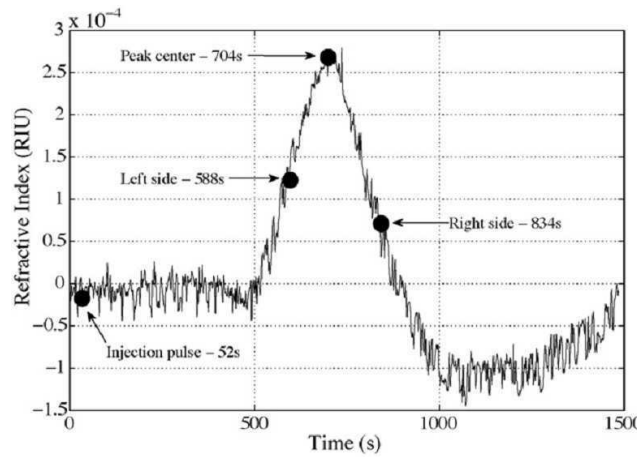


Figura 3.28: Resultado experimental Método de Taylor- Solução a 10% (4g/l) de BSA-água.

Os dados experimentais (Taylor) para a solução aquosa de albumina bovina sérica (BSA) 10% (4g/l) obtidos são:

$$t_b = 246s \text{ e } t_p = 652s \text{ e } R_0 = \text{raio interno de } 3.810^{-4}m$$

Pela equação (3.13) ($D = R_0^2 t_p / 24 \Delta t_b^2$) o coeficiente de difusão D , medido experimentalmente, para BSA, foi:

$$D = (6.48 \pm 0.12) 10^{-11} m^2/s$$

A pequena distorção do perfil ideal gaussiano simétrico é devida, principalmente, aos efeitos de adsorção da proteína durante o transporte ao longo do tubo. O valor do coeficiente D , determinado experimentalmente, é bem próximo ao da literatura existente que variam entre $(5, 8 \text{ e } 6, 44) \cdot 10^{-11} m^2/s$ para BSA, conforme publicado em [34], e não existem ainda valores conside-

rados exatos.

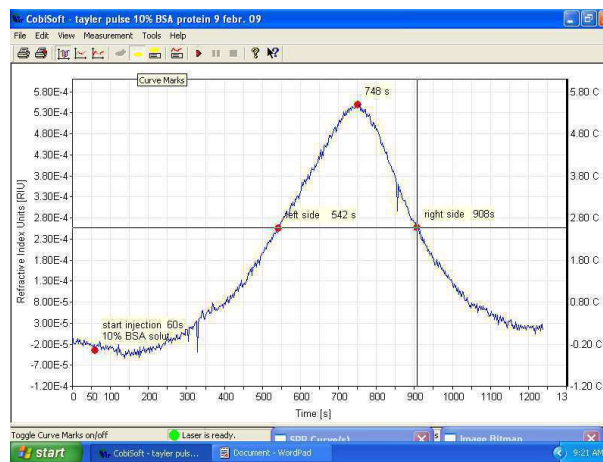


Figura 3.29: Outro resultado do método de Taylor para BSA-água.



Figura 3.30: Mais um exemplo de medição com o Método de Taylor para BSA.

3) Resultados por Simulação Numérica

O perfil da distribuição em forma de escova do fluxo de difusão/corrente, e a geometria da célula de fluxo, são ilustrados na Figura 3.31a. As soluções aquosas de etanol ou de proteína são admitidas na entrada da célula de fluxo. Na Figura 3.31b são mostradas, na representação em falsas cores, imagens da distribuição de concentração calculada, tomadas imediatamente depois da entrada da solução a 5%(v/v) de etanol-água na entrada da célula em 4,05s; em 15,02s e depois de um período de tempo de 26s. A velocidade do fluxo de entrada foi fixada em um valor baixo de 0,8mm/s, assumindo um perfil inicial de concentração como um pulso ideal retangular.

Na Figura 3.32 é mostrado o cálculo, congelado, do perfil de concentração após um período de

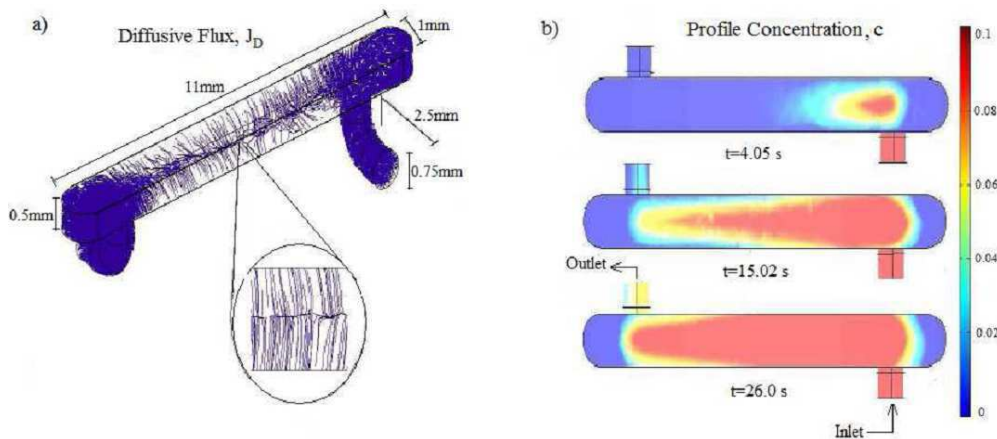


Figura 3.31: Distribuição da concentração na célula de fluxo - a) A secção circular ampliada confirma o transporte difusivo unidimensional no centro da célula de fluxo. b) Representação em falsas cores da distribuição de concentração.

tempo de 5 segundos, tomadas no centro da célula de fluxo, aproximadamente, assemelhando-se à forma de Gauss. A inserção revela o comportamento depois de 15 e 26s, e indica um aumento da concentração para as paredes. O perfil inicial de Gauss aparece distorcido. Condições de estado constantes são estabelecidas após um período prolongado de tempo, correspondente à concentração na entrada. A concentração máxima é mantida durante todo o tempo, na faixa no centro da célula de fluxo, e as correntes resultantes difusivas são, portanto, simetricamente direcionadas, com pouca distorção, para ambas as paredes celulares de fluxo. Assim, a direção atual é claramente unidirecional.

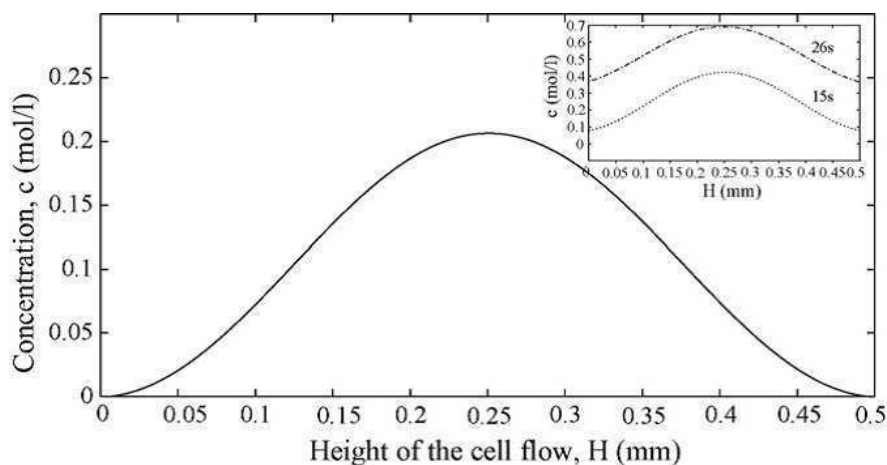


Figura 3.32: Perfil Gaussiano inicial da concentração entre as paredes da célula de fluxo depois de 5s. Na janela é ilustrada mudança no perfil de concentração depois de 15 e 26s.

Isso justifica a utilização do expoente de escala $1 - dim, n = 0,5$ em nossos cálculos. No entanto, na direção das regiões de entrada e saída a direção do fluxo é cada vez mais indireta e turbulenta. A evolução temporal simulada da concentração do analito, perto da parede celular, no centro da célula de fluxo, é ilustrada na Figura 3.33 para valores diferentes das constantes de difusão do analito, ou seja, $(0,65; 1,0; 1,5; 2,5)10^{-9}m^2/s$. Para a 5% (v/v) de etanol e água solução e usando $D = 0,6510^{-9}m^2/s$, o tempo de difusão obtido é: $\Delta\tau_{Diff} \approx 26s$. Nesta figura também se indica que, para substâncias com baixo valor de D (substâncias de elevado peso molecular como a solução aquosa de BSA), o tempo de difusão é muito maior do que para substâncias com altos valores de D (substâncias de baixo peso molecular, como a solução etanol-água). A simulação do método de Taylor, Figura 3.34, retrata o pulso de concentração, no domínio do tempo, depois de viajar ao longo do tubo de $3,4m$ de comprimento, para a célula de fluxo. Para um fluxo constante de $140\mu l/min$, a difusividade resulta em $D = 0,63910^{-9}m^2/s$ para 5% (v/v) de etanol-água e em $D = 6,4110^{-11}m^2/s$ de 10%(4g/l) para a solução de BSA-água (Figura 3.35), respectivamente. Para baixos valores de D , as simulações revelam um perfil assimétrico. Atribuímos isso, principalmente, à influência da geometria, devido à redução substancial da difusão da proteína, perpendicular à direção do fluxo. Isso resulta em um tempo de difusão aumentado e atraso na detecção dentro do volume de detecção do SPR (variando aproximadamente de $0,5\mu m$, entre a superfície de ouro para o volume da célula), em comparação com etanol. Além disso, a difusão para o volume morto, na entrada da célula, pode ter influência.

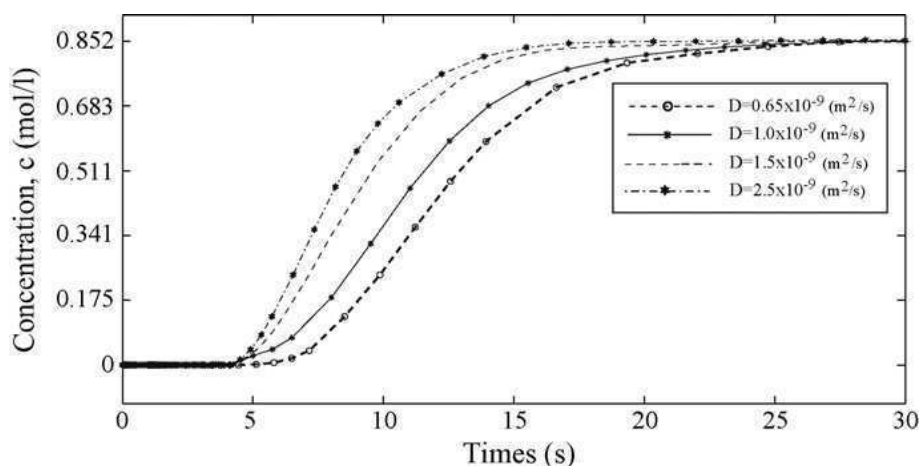


Figura 3.33: Evolução temporal da concentração do soluto ($0,852mol/l$) para vários coeficientes de difusão, calculados próximo à parede a uma distância de $0,5\mu m$, pela combinação das equações CDE e NSE para um perfil retangular de concentração.

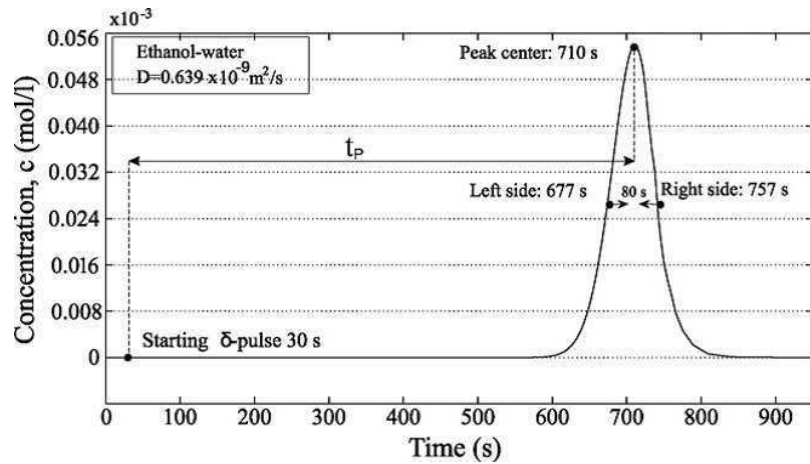


Figura 3.34: Resultados da simulação para a combinação da CDE com a NSE para o δ -pulso de entrada de 3s para uma solução de 5% etanol-água. O atraso do pulso é de 30s . O tempo de transporte t_p está indicado.

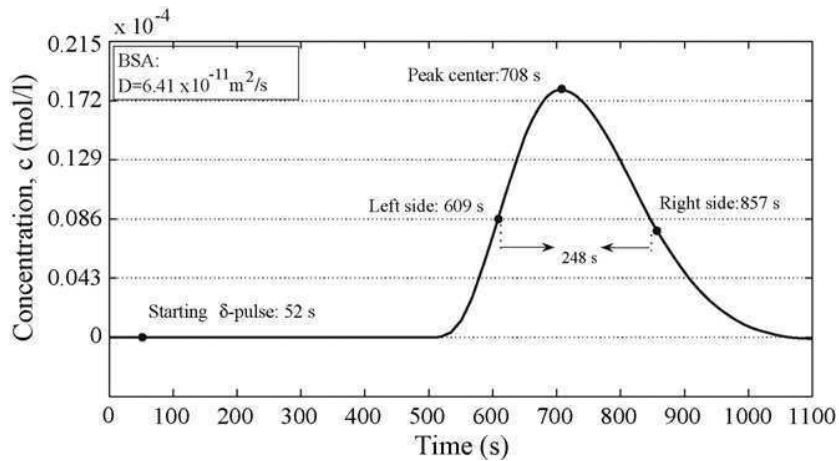


Figura 3.35: Resultados da simulação para um δ -pulso de 3s para uma solução de 10% (4g/l) BSA-água pelo método de Taylor. Atraso do pulso de 52s .

3.2.5 Discussão dos resultados

Os resultados experimentais do coeficiente D , obtidos pelo método desenvolvido de Detecção Direta e pelo método de Dispersão de Taylor, e da literatura [34], estão ilustrados na Tabela 3.2.

Comparando-se os dois resultados, de detecção do coeficiente de difusão, D , para a solução etanol-água, vê-se que a diferença entre o método direto desenvolvido neste trabalho e o de Taylor está na faixa tolerável, de aproximadamente 4% . O valor do coeficiente D , determinado experimentalmente para BSA, é bem próximo ao da literatura existente, conforme publicado em [34]. A partir de ambos, experimentos e simulação numérica, o tempo de difusão pôde ser cal-

Tabela 3.2: Resultados experimentais pelo Método de Taylor, Detecção Direta e da Literatura.

Solução	D-Método direto (m^2/s)	D- Dispersão de Taylor (m^2/s)	D-Literatura (m^2/s)
Etanol-água	$(0,65 \pm 0,14) \times 10^{-9}$	$(0,625 \pm 0,12) \times 10^{-9}$	—
BSA-água	—	$(6,48 \pm 0,12) \times 10^{-11}$	$(5,8 \pm 6,44) \times 10^{-11}$

culado. Assumindo-se uma velocidade de fluxo muito baixa (em torno de $0,8\text{mm/s}$) o tempo de difusão do etanol na água foi estimado em $\Delta\tau_{Diff} = 26\text{s}$ a partir da simulação, enquanto $\Delta\tau_{Diff} = 24,28\text{s}$ foi observado experimentalmente, por extrapolação linear da curva $\Delta c/\Delta\tau_{tot}$, ilustrado na Figura 3.23, para velocidade de fluxo zero. A diferença de aproximadamente 6,6% pode ser explicado devido a alguns problemas de convergência da equação de difusão-convectiva que podem ocorrer durante a execução da simulação de elementos finitos, especialmente quando a convecção excede o termo difusivo. Este efeito parece ser mais pronunciado para substâncias de elevado peso molecular, como BSA. A velocidade de entrada utilizada em nosso modelo foi baseado na velocidade real fornecida pela bomba peristáltica, e quando o coeficiente de difusão é menor (resultando em maior espalhamento da concentração de proteína no interior do tubo de transporte), o termo de convecção aumenta. Refinamento da malha ou ajustes nos algoritmos de elementos finitos são adequadas para reduzir esta limitação.

Há incerteza sobre a altura exata da célula de fluxo microfluídica que é afetada pelo arranjo de vedação que é usado. Neste trabalho, um anel (O-ring) de vedação elastomérico tem sido utilizado, que tende a deformar-se por uma quantidade pouco conhecida, sob uma carga de pressão de vedação aplicada. Deformações mecânicas na faixa de 10% ocorrem comumente. Embora estes desvios sejam sistemáticos, o uso de algum tipo de estratégia de calibração pode ser uma boa alternativa para reduzir esse efeito. Efeitos externos, como desvio de temperatura ou mesmo ligações fracas, não específicas, com a parede do tubo, durante o transporte, afetam o desempenho do sensor SPR e podem causar mais desvios nas leituras de saída do índice de refração do sensor SPR. Apesar destas limitações já mencionadas e as diferenças associadas entre as simulações e resultados experimentais, o modelo numérico pode ser considerado confiável. Assim, é também adequado para uma avaliação dos efeitos da temperatura sobre a difusão do soluto mútuo, uma vez que todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente de 26C . Como pode ser visto a partir de estudos recentes [112], [113], as flutuações de temperatura (superiores a $0,1\text{C}$) têm um impacto sobre a estabilidade instrumental, bem como sobre as propriedades fluídicas

materiais (como viscosidade e densidade) de um sensor SPR.

Devido às pequenas concentrações de soluto (etanol ou BSA) injetado na forma de um pulso— δ , quando se utiliza o método de Taylor, a propriedade da solução pode ser aproximada à da água. Considerando-se os efeitos no ENS e modelos ECD, para os valores de D , e também através de interpolação, a dependência da temperatura pode ser calculada [112]. Além do valor do coeficiente de difusão, esta variação também afeta a sensibilidade e relação sinal-ruído do sensor SPR. A resolução do sensor SPR é tomado como três vezes o desvio padrão de erro no índice de refração, que é determinada, com base no especificação do fabricante, como $\sigma = 0,910^{-6}$. Além disso, a razão entre o sinal de saída (RIU) e a propriedade medida é dada por uma curva de calibração e seu valor é constante durante todo o intervalo de sensoriamento. Nas aplicações com SPR, normalmente, duas diferentes unidades para o sinal de saída são usadas: uma unidade de ressonância (RU) e uma unidade de índice de refração (RIU). Neste trabalho é usado o RIU, que corresponde tanto ao índice de refração absoluto como às suas variações. Para o método de Fick, a precisão do sensor ΔD é determinada como:

$$\Delta D = \pm 0,1410^{-9} m^2/s$$

Para a abordagem de Taylor, a resolução é um pouco melhor:

$$\Delta D = \pm 0,1210^{-9} m^2/s.$$

Enquanto o método Taylor se aplica a solutos com lenta e rápida difusão, a abordagem direta em nossa configuração é limitada à detecção de microfluidos com relativamente elevados valores de D . O motivo é a limitada estabilidade, a longo prazo, do instrumento SPR, onde uma aparente deriva térmica instrumental, em um horizonte temporal de 1000-2000s, causa distorções no sinal de saída. No entanto, com adequada instrumentação para controle de temperatura e laboratório operacional com condições otimizadas, o nível de ruído e deriva do sensor pode ser mantida em níveis muito baixos. E, principalmente, a abordagem direta pode ser estendida para solutos com baixos valores de D .

3.2.6 Considerações finais do capítulo

Neste capítulo foram realizadas análises da resposta transitória do sistema microfluídico e apresentados os novos métodos experimentais desenvolvidos, sem adsorção na superfície de detecção do sensor SPR. No capítulo seguinte são apresentados os métodos de análise com adsorção.

Capítulo 4

Análise dos sistemas microfluídicos com adsorção na superfície de detecção

O conhecimento dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos, no processo de interação de biomoléculas, permite a caracterização detalhada de várias classes de moléculas de relevância clínica, como por exemplo, anticorpos. Contudo, embora exista uma variedade de tecnologias (cromatografia, microscopia, eletroforese etc.) para determinação desses parâmetros, apenas poucas dessas técnicas possibilitam a determinação direta das constantes cinéticas de adsorção e de dessorção. Ainda mais, um dos requisitos importantes em imunoenaios é que os anticorpos devem se ligar rapidamente e com uma forte interação, ou seja, a taxa de dessorção deve ser baixa para que estes não se desliguem facilmente, viabilizando, assim, maior sensibilidade nas reações com uma menor quantidade de anticorpos. Porém, também com os métodos imunológicos mais conhecidos (Radio Imunoensaio-RIA, cromatografia por imunoafinidade-IAC e ELISA) não é possível se distinguir os padrões de ligação pelas fases de associação e dessorção.

Desse modo, o estudo da cinética e termodinâmica na adsorção de substâncias como a biotina, proteínas globulares e anticorpos é importante para se identificar substâncias mais adequadas para as camadas de imobilização, tendo em vista maior estabilidade na interação e menor custo.

O método desenvolvido neste trabalho, baseado na tecnologia SPR, permite determinar as constantes cinéticas de adsorção e dessorção, de modo direto, pela monitoramento em tempo real da evolução da cobertura da superfície nos processos de adsorção de substâncias de interesse. Com este método e baseando-se no modelo de adsorção de Langmuir, foram efetuadas análises

de adsorção de biotina, proteínas (avidina, neutravidina, BSA) como também de soro humano.

Baseando-se nesse estudo, também foi proposto, neste trabalho, uma prova de conceito de um método inovador para detecção e identificação dos vírus dengue (DENV 1,2,3,4) em soro (sangue centrifugado) humano.

4.1 Método para análise da cinética de adsorção da biotina

Neste ítem do trabalho, é descrito o método experimental desenvolvido para análise da cinética de adsorção, utilizando o dispositivo microfluídico SPR, e sua aplicação para a análise da adsorção da biotina na superfície de ouro do sensor.

A molécula de biotina é um ligante bem conhecido (composição química $C_{10}H_{16}N_2O_3S$) também chamada de vitamina H ou vitamina do complexo-B. Além das suas várias funções fisiológicas no metabolismo celular, a biotina é amplamente usada como um reagente para a análise bioquímica. Através da sua alta afinidade para formação de complexo com avidina, estreptavidina e neutravidina, serve como uma importante molécula ligante na concepção dos bioensaios imunquímicos, especialmente quando se utilizam anticorpos biotinilados. A biotina, uma pequena vitamina (1,1 nm), [114], tem grande afinidade com a avidina, uma glicoproteína de elevada massa molecular, [11]. O composto pode ser dissolvido em água em concentrações molares entre 0,916mM e 3,3 mM em etanol puro. As estruturas destas moléculas, como mostrado na Figura 4.1 compreendem um anel de ureído (tetrahydroimidizalone), fundido com um anel hidrotiofeno. As moléculas de biotina podem se ligar a um substrato de ouro preferencialmente pelo átomo de enxofre ou pelo grupo terminal carboxílico [115].

Os mecanismos cinéticos na adsorção de biotina livre, dissolvida em água sobre a superfície quase lisa ([26]) do ouro, bem como as suas interações com soro, ainda não são bem conhecidos. Essas informações são importantes para se obter um melhor entendimento dos mecanismos de ligações não-específicas que ocorrem quando se utilizam fluidos corporais, necessários em ensaios para diagnósticos médicos.

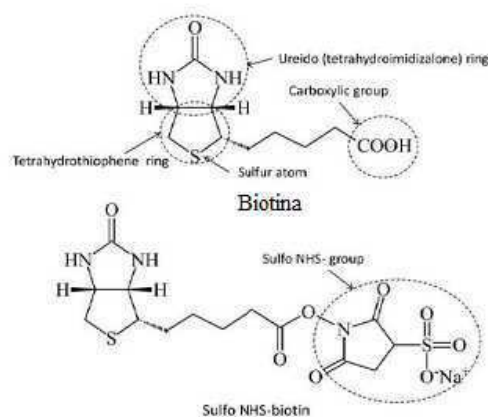


Figura 4.1: Fórmulas estruturais de biotina e biotina sulfonada (sulfo-NHS-biotina). Adaptada da Ref. [115].

4.1.1 Detalhamento do método e materiais

Com este método é feita uma análise do crescimento do filme de biotina, em solução aquosa em misturas de etanol-água, medindo e gravando a evolução temporal do crescimento da camada para diferentes concentrações. Esta abordagem permite o controle e verificação de crescimento do filme e da sua qualidade, através do monitoramento em tempo real. Para isso foi utilizado o sensor de ressonância de plasma de superfície (SPR). A cinética de adsorção e cobertura de biotina livre, no filme fino de ouro, foi quantificada, baseando-se nos dados gerados pelo sensor. Uma das vantagens dessa abordagem, em relação a outras medições, é o uso de biotina livre, dissolvida numa solução aquosa, ao invés de se utilizar formas de biotina quimicamente mais complexas e de solventes orgânicos.

A mudança do ângulo de ressonância de plasma de superfície foi usada para estimar a espessura do filme e os parâmetros ópticos. O sinal de saída do dispositivo SPR é a variação do índice de refração, quando se faz a admissão da solução do analito em análise, e registrado como função do tempo. Com os valores conhecidos do tamanho da molécula de adsorvente e o índice de refração correspondente, a cobertura do filme imobilizado pode ser estimada, com precisão suficiente. A partir de uma formulação de Fresnel de 4 camadas, tal como descrito em detalhe na referência [116] e mostrada no ítem 2.4.3 deste trabalho, uma expressão linear para o índice de refração efetivo n_s^{eff} de um filme em camada fina com espessura d_3 foi definida anteriormente neste trabalho como Equação (2.34):

$$n_s^{eff} = [2\pi d_3(-\varepsilon_{mr}n_4^2)^{\frac{3}{2}}(n_3^2 - n_4^2)/\lambda(\varepsilon_{mr} - n_4^2)^2n_3^2] + n_4$$

e pela equação (2.35)

$$\Delta n_s^{eff} = (n_s^{eff} - n_4)$$

onde Δn_s^{eff} representa a variação do índice de refração de um filme molecular adsorvido; n_4 é o índice de refração da solução aquosa de PBS próxima à superfície; e n_3 o índice de refração da biotina. A definição de um índice de refração eficaz n_s^{eff} leva em conta que a profundidade de detecção do sensor óptico SPR prolonga-se através do filme adsorvido por cerca de $300nm$ para a solução tampão dielétrica aquosa adjacente, e ambos os meios contribuem de forma diferente para o sinal de saída. A imobilização de biotina sobre a película de metal foi detectada e quantificada por detecção SPR no modo de interrogação angular. A temperatura do instrumento foi mantida estável, a $21,4 \pm 0,2C$, ao longo do período de aquisição de dados. O fluxo de admissão do analito foi fixado em $160\mu L/min$, e condições de fluxo laminar são mantidas. A célula de fluxo compreende um volume de $7\mu L$. O tamanho da área de detecção é de $1mm^2$, situado no centro da célula de fluxo. O tempo de resposta do sistema, e resolução temporal, é de $2s$, em grande parte definidos e limitados pela aquisição de dados e software de processamento. A biotina (Fluka, > 99% puro) utilizada foi dissolvida em solução tampão fosfato-salino (PBS), e preparada com água ultra-pura e em misturas com 50% de etanol-PBS. *Biochips* poliméricos SPR descartáveis foram utilizados para os experimentos, cobertos com uma película de ouro de $50nm$ na área de detecção. Utilizando microscopia de transmissão de alta resolução (TEM) confirmou-se que o filme fino de ouro tem variação de espessura muito pequena, e valores associados de rugosidade de superfície $\delta_{rms} = 4,35nm$, publicados em [26]. Desse modo, o ângulo e a ressonância SPR, não são praticamente afetados pela rugosidade da superfície destes *biochips*. A limpeza da superfície da camada de ouro é crucial para se manter a reprodutibilidade dos resultados e foi efetuada no interior da célula de fluxo, na ausência de qualquer contato e possíveis contaminações do ar ambiente. Vários ciclos iniciais breves de limpeza da superfície com etanol (p.a.) NaOCl (hipoclorito de sódio) concentrado (pH=1,3) e uma pequena lavagem final da superfície de $5s$ com solução concentrado de H_2O_2 (pH=1) estabeleceu uma superfície de ouro hidroxilada, e um estado da superfície hidrofílica estável, antes da admissão de PBS puro e da solução de PBS contendo biotina. Todos os ciclos de lavagem foram realizados na célula de fluxo, com condições da superfície controladas e verificadas usando o dispositivo SPR.

4.1.2 Discussão dos experimentos

Como foi mencionado no item 2.4.3, assumindo cobertura de superfície completa e homogênea com 100% do fator de preenchimento, a possível variação máxima ideal do índice de refração, denominada Δn_{mol}^{max} , pode ser calculada, desde que d_3 e n_3 sejam conhecidos. O comprimento da onda aplicada λ é fixado em $670nm$. De acordo com [117] a constante dielétrica complexa do filme de ouro fino é tomada como $\epsilon_{mr} = -14,6 + i0.8$ em $1,85 eV$, onde a função espectral da função dielétrica apresenta um mínimo acentuado. Devido à pequena contribuição da parte imaginária só a parte real da função dielétrica é considerada, sem adição de erro significativo para o método de aquisição de dados. O índice de refração de uma solução aquosa de PBS, à temperatura ambiente, é $n_4 = 1,339$, determinado a partir de medições SPR para uma solução tampão (massa). Todas as constantes dielétricas e parâmetros de espessuras, utilizados na presente análise, são listados na Tabela 4.1. Todas as quantidades foram mantidas constantes para a análise cinética.

Tabela 4.1: Constantes dielétricas e espessuras utilizados na presente análise.

Ouro		Polímero		Camada de Biotina		Sol. Aquosa PBS	
Espessura	Part.opt.	Espessura	Part.opt.	Espessura	Part.opt.	Espessura	Part.opt.
d_1	$\epsilon_{mr}(670nm)$	d_2	$n_2(670nm)$	$d_3(nm)$	n_3	d_4	n_4
$50nm$	$-14,6$	∞	$1,53$	$(1, 1 \pm 0, 1)$	$(1, 5557 \pm 0, 09)$	∞	$1,339$

De acordo com os resultados dos experimentos, relatados em [114], o tamanho da molécula de biotina é de $1,1 nm$. Valores de índice de refração determinados experimentalmente de adsorventes biotina dentro da faixa dada de comprimentos de onda variam amplamente. De acordo com a referência [118], um valor do índice de refração (RIU) de $1,455$ aplica-se a filmes multicamada biotina sobre substratos C-Si, que foram obtidos por elipsometria espectroscópica. Um valor de $1,62$ RIU (no comprimento de onda de $632 nm$), feita a partir de gravações de SPR, foi relatado para uma única camada de biotina em ouro em [117]. A média destes dois valores, com $n_3 = 1,541 \pm 0,09$ RIU, com uma elevada incerteza $\pm 0,09$ RIU, corresponde aproximadamente a $1,557$ RIU, utilizado na presente análise. Com os dados fornecidos para definir a espessura individual e parâmetros ópticos, mostrada na Tabela 4.1, a variação máxima possível para um índice de refração, de mono-camada homogênea de biotina com espessura ideal d_3 , na ausência de qualquer espaço livre entre moléculas adjacentes, mantendo cobertura de superfície de $1ML$, foi calculada a partir da equação (2.34) como:

$$\Delta n_{mol}^{max} = (0, 96 \pm 0, 06)10^{-3} \text{ RIU}; \text{ ML significa monocamada e RIU a unidade de índice}$$

de refração. Valores $RIU < \Delta n_{mol}^{max}$ indicam, assim, fração de cobertura de superfície $\theta < 1$ ML. Assim, para valores determinados experimentalmente de Δn_s^{eff} , a fração da cobertura de superfície molecular adimensional θC é calculada como:

$$\theta(C) = \frac{\Delta n_s^{eff}(C)}{\Delta n_{mol}^{max}} \quad (4.1)$$

Em relação à resolução instrumental de três vezes o desvio padrão (3σ) do índice de refração ($\delta n \approx 2 \times 10^{-5}$ RIU), o limite detectável inferior da cobertura da superfície com biotina é $\theta_{min} \approx 0,02$ ML.

A cobertura de superfície molecular, em regime estacionário, atribuída à isoterma de adsorção de Langmuir, varia com a concentração do seguinte modo:

$$\theta(C) = \frac{K_{eq}C}{1 + K_{eq}C} \quad (4.2)$$

na qual K_{eq} é a constante de equilíbrio de Langmuir, e C a concentração do soluto. É importante notar que a cobertura é independente da camada fina metálica selecionada. Ao se traçar $(1/\theta^\infty)$ em função de $1/C$, obtém-se o inverso $(1/K_{eq})$ e, conseqüentemente, a constante de ligação é determinada, com precisão. Considera-se que o sistema de adsorção selecionado siga uma evolução temporal de primeira ordem (exponencial), com $K_{eq} = k_a/k_d$. Com esta notação, k_a é a constante cinética de adsorção, e k_d constante cinética de dissorção. Além disso, de acordo com o método geométrico fornecido em [119] e [120], a partir da inclinação temporal inicial $k_0 = \Delta\theta/\Delta t$, as constantes cinéticas associadas são determinadas como:

$$k_a = 2\frac{K_0}{C}, \quad (4.3)$$

e

$$k_d = 2\frac{K_0(1 - \theta^\infty)}{\theta^\infty}. \quad (4.4)$$

A energia livre de adsorção ΔG_{ads} , a partir da constante de equilíbrio para a monocamada de biotina, é obtida com a Equação (2.43):

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln(K_{eq}).$$

Na Figura 4.2 é mostrada a evolução temporal da mudança de cobertura, devida à formação de

uma camada de biotina, ao longo de um período de tempo de 800 s e para 5 diferentes concentrações molares variando de 0,082 a 2,05 mM. As moléculas são adsorvidas numa película de ouro fina de 50nm, com a variação máxima obtida com 50% de mistura de etanol-PBS.

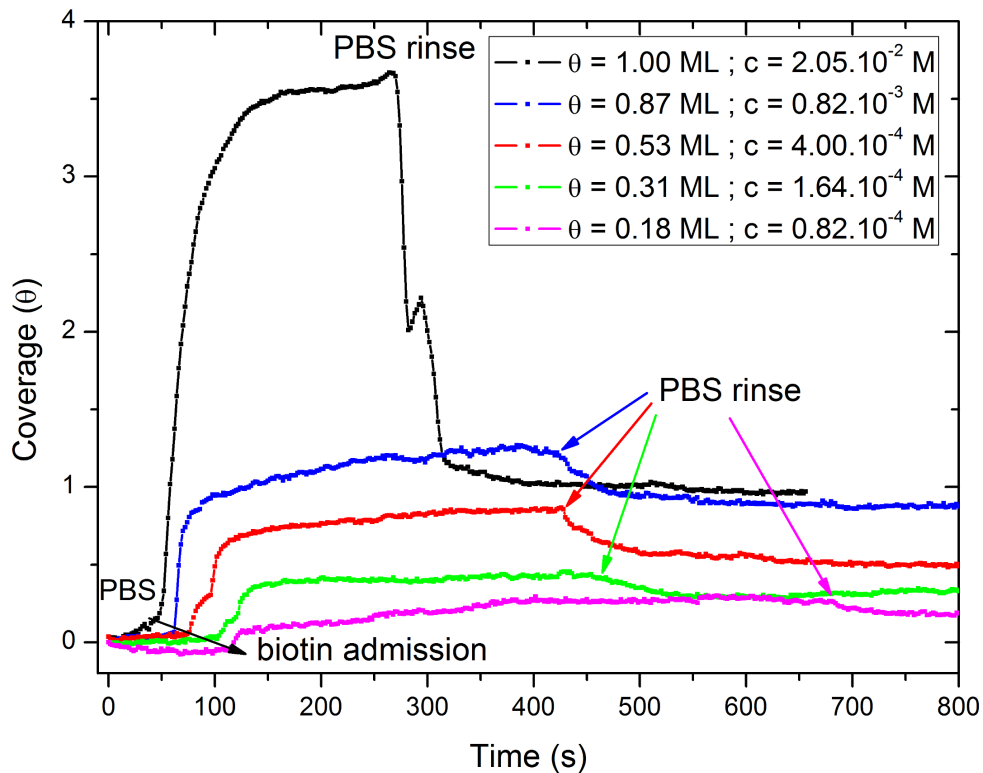


Figura 4.2: Evolução da mudança de cobertura em função do tempo para diferentes concentrações de biotina, variando entre 0,082 e 2,05 mM.

Estão indicados, nas curvas de adsorção, os valores de equilíbrio para a cobertura de superfície, θ , após a lavagem com solução-tampão de PBS, juntamente com os valores de concentrações de biotina. Inicialmente, um aumento rápido, quase linear, do sinal de saída (com inclinação k_0) é observada por poucos segundos, mas a variação diminui para tempos de exposição mais longos. Em baixa concentração $k_0 = 9,910^{-3} \text{ML/s}$. Evidentemente, a evolução temporal da ligação de biotina não é exatamente a descrita por um sistema de primeira ordem. A cobertura de superfície de equilíbrio correspondente foi determinada baseando-se na equação (4.1). Para a solução de etanol a 50%-PBS, exatamente uma única monocamada (ML) é adsorvida sobre a película de metal, depois de uma lavagem de PBS. A lavagem remove a fração de biotina fracamente ad-

sorvida, em que as interações biotina-biotina dominam, e são observadas inicialmente formação de até três camadas. Na Figura 4.3 são ilustrados possíveis arranjos moleculares onde aparentemente o átomo de enxofre da molécula de biotina pode ser anexada na superfície de ouro através da hidroxila (da superfície). Ainda, a biotina é preferencialmente adsorvida em ouro através do átomo de enxofre. No entanto, a cadeia lateral com o grupo carboxílico permite a formação de um complexo estável bimolecular da biotina, adsorvida em ouro, através de ligações duplas de hidrogênio formadas com os grupos carboxílicos (Figura 4.3a). Outro possível arranjo molecular é a formação de uma única ligação de hidrogênio entre o grupo carboxílico de uma molécula e um anel de ureído (tetrahydroimidizalone) de outra molécula (Figura 4.3b), de acordo com [121].

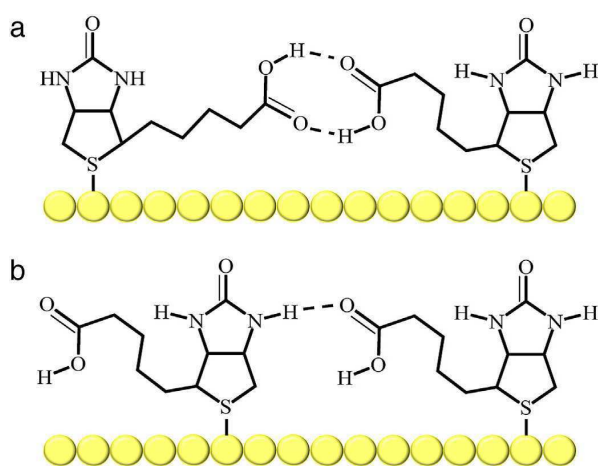


Figura 4.3: Possíveis representações de um complexo bimolecular estável de biotina em ouro, mantidos juntos por meio de (a) ligação de hidrogênio dupla formada pelos grupos carboxílicos e duas moléculas, (b) uma ligação simples de hidrogênio formada entre o grupo carboxílico de uma molécula e o anel de ureído (tetrahydroimidizalone) de outra molécula. Figura adaptada de [121]

Na Figura 4.4 é ilustrado o gráfico, em que a variação da cobertura superficial de equilíbrio é mostrada em função da concentração de biotina. Na inserção é mostrado um gráfico do inverso das quantidades, $1/\theta$ e $1/C$, a partir do qual a constante de equilíbrio K_{eq} é determinada como sendo $K_{eq} = 2940 \pm 100 \text{ mol}^{-1}$, com alta precisão, como indicado na figura.

A partir deste conjunto de dados os parâmetros cinéticos listados na Tabela 4.2 foram determinados (ver segunda linha). Para comparação, estão mostrados nesta Tabela 4.2 os parâmetros cinéticos para o ouro e três diferentes combinações de complexos thiol/solução (associados à formação de uma monocamada automontada no substrato de ouro).

No caso do composto octanethiol/n-hexano os valores da energia de ligação ΔG_{ads} e a cons-

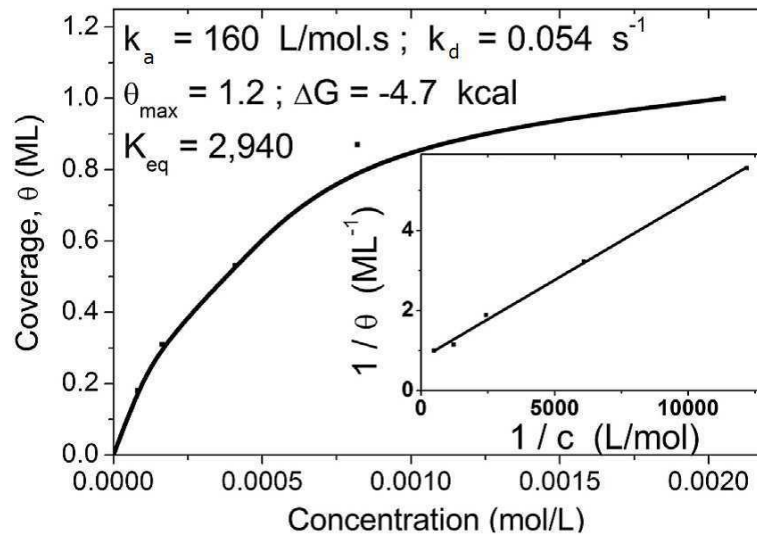


Figura 4.4: Diagrama com a variação da cobertura superficial de equilíbrio versus concentração de biotina. A inserção representa o inverso da cobertura de superfície ($1/\theta$) em função do inverso da concentração de biotina (C).

Tabela 4.2: Parâmetros cinéticos para a adsorção de biotina e de diferentes compostos de tiol no ouro.

Composto	K_{eq}/mol^{-1}	$k_0(RIU/s)$	$K_a/(M/s)$	$K_d/(s^{-1})$	$\Delta G_{ads}/(kcal/mol)$
Biotina	2940 ± 100	$9,9 \times 10^{-3}$	160 ± 60	$(5,44 \pm 2,44)10^{-2}$	$-4,7 \pm 0,15$
11Octadecanethiol/n-hexano	$15,250 \pm 7300$	–	2440 ± 1074	$0,16 \pm 0,03$	$-5,6 \pm 0,2$
1Octadecanethiol/cyclohexano	850 ± 8950	–	2059 ± 1394	$0,19 \pm 0,09$	$-5,5 \pm 0,4$
1Octanethiol/n-hexano	1930 ± 840	–	811 ± 334	$0,42 \pm 0,06$	$-4,4 \pm 0,2$

tante de equilíbrio K_{eq} são bem próximos para as ligações com biotina e com tiol. As moléculas de biotina podem se anexar a uma superfície de ouro através do átomo de enxofre (ligação S-Au muito forte) ou via grupo terminal carboxílico. Apesar da semelhança entre a adsorção de tiol, sulfureto e de ácidos carboxílicos, foi observado que a maioria dos ácidos carboxílicos é adsorvida no ouro apenas se os potenciais elétricos positivos são aplicados ao metal. Os tióis ou sulfetos, ao contrário, adsorvem prontamente em superfícies de ouro, sem aplicação de potencial elétrico [115]. Outro possível arranjo molecular é a formação de uma única ligação de hidrogênio entre o grupo carboxílico de uma molécula e um anel de ureído (tetrahydroimidizalone) de outra molécula (Figura 4.3b). Na Figura 4.5 é ilustrada a possível disposição molecular da formação de até

três camadas de biotina observada para solução de etanol a 50%-PBS. Aparentemente, a molécula de biotina é ligada à superfície do ouro através do átomo de enxofre e interações biotina-biotina dominam. Depois de uma lavagem PBS, apenas uma monocamada de biotina no filme de ouro é detectada. A solução PBS lava e remove a fração de biotina fracamente adsorvida, como ilustrado. A representação é meramente uma descrição da natureza química da camada adsorvida, sem qualquer convicção sobre a orientação das cadeias.

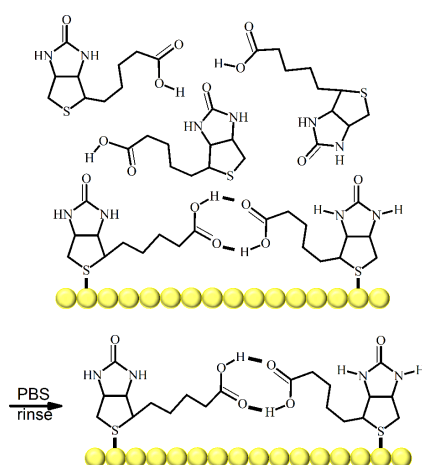


Figura 4.5: Possível arranjo molecular da adsorção de biotina no ouro a partir de uma configuração multicamadas para uma formação em monocamada, após lavagem PBS. Figura adaptada de [121]

As reações químicas de ésteres NHS, ésteres de sulfo-NHS e biotina livre são essencialmente idênticas, no sentido de que todos eles reagem espontaneamente com grupos amino primários que se encontram presentes como cadeia lateral de lisina ϵ -amines e N-terminal α -aminas para formar ligação amida. Os grupos funcionais disponíveis na superfície da proteína, para serem biotinizados, podem não ser conhecidos. No entanto, para a maioria das proteínas, é razoável assumir que as aminas primárias são disponíveis e acessíveis para serem conjugadas com biotina (biotinizadas).

4.1.3 Análise das interações bioquímicas da biotina com neutravidina e soro humano

Neutravidina é a forma deglicosilada da avidina, onde a fração do carboidrato é removida da molécula, enquanto a estrutura molecular permanece praticamente inalterada. Por sua vez, a avidina é um tetrâmero com quatro domínios de ligação idênticos para a biotina. Foram realizados

experimentos de ligação da biotina com proteínas como neutravidina e as constituintes no soro humano (HS). As interações bioquímicas da biotina com a neutravidina (NA) e com soro humano são importantes no estudo da sensibilidade dos imunossaios para se tentar reduzir ligações não específicas, e ocorrências de resultados falso-positivos relacionados. Estas ligações estão ilustradas nas Figuras 4.6 e 4.7. Ambos os solutos foram diluídas com PBS. A forte ligação química quase covalente entre a biotina e a avidina, ou com os seus derivados quimicamente semelhantes como neutravidina e estreptavidina, é bem conhecida [116], [117]. Essa característica representa um componente essencial para numerosos imunossaios com camadas sanduiche, onde a ligação inicial da proteína permite a imobilização definida de anticorpos biotinilados em substratos sólidos. Ligação molecular de NA em filmes de biotina sulfonados sobre o ouro foram explorados antes de se utilizar, no entanto, os solventes orgânicos [117]. Os presentes dados confirmam essencialmente propriedades de ligação quase idêntica de biotina livre, quando dissolvida numa solução aquosa. Na Figura 4.6 é ilustrada a evolução temporal da variação do índice de refração de $2,5 \times 10^{-3}$ RIU, devido à imobilização de uma camada de neutravidina (concentração de $20 \mu\text{g/ml}$ PBS) sobre uma camada de biotina, depositada anteriormente, em solução aquosa de PBS.

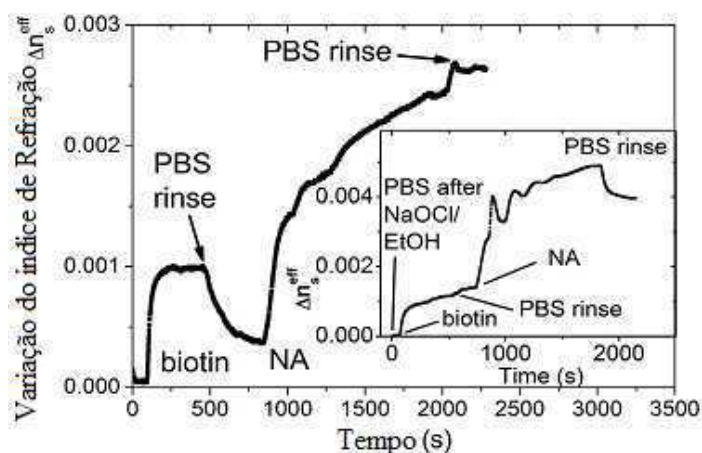


Figura 4.6: Evolução da mudança do índice de refração em função do tempo quando da admissão da biotina seguida da admissão de neutravidina (NA). Na janela é mostrado o efeito do pré-tratamento na superfície de ouro sobre a ligação de NA, revelando um padrão de adsorção oscilante invulgar da proteína.

O crescimento do filme de neutravidina até $\theta \approx 0,4$ ML é um pouco lento e persiste ao longo de um intervalo de tempo de 1.500 s. Antes da admissão da biotina contendo solução de PBS, a superfície da película de ouro foi brevemente limpa com H_2O_2 , em seguida, enxaguada com PBS.

Uma característica interessante é mostrada na janela inserida na Figura 4.6, e ilustra a influência da preparação da superfície. Aqui, antes da admissão da biotina contendo solução aquosa PBS, a superfície do ouro foi inicialmente tratada com uma solução de hipoclorito de sódio. Isto deixa traços de íons Cl^- na superfície de ouro, e contribui com um aumento da cobertura de equilíbrio de biotina na superfície para $\theta_{bio} \approx 1,2$ ML, ligeiramente superior a uma monocamada completa. Aparentemente, a presença associada de uma fração de segunda camada de biotina fracamente ligada é responsável por modulações distintas e por padrão oscilatório de adsorção/dessorção de NA, respectivamente, que se torna mais fraco no início da saturação. No entanto, essa característica oscilatória um pouco incomum de adsorção de proteína também pode ser afetada por (ou proveniente de) variações temporais de densidade ou retração/expansão da proteína NA, em função da cobertura de superfície. Um efeito similar foi relatado recentemente na referência [122].

Para se realizar um imunensaio com imunossensores, em geral torna-se necessário se estudar formas de redução de ligações não específicas. Para isso fez-se um estudo da interação da biotina com soro humano, o qual é necessário em diagnósticos médicos, como na detecção do vírus dengue, por exemplo. Na Figura 4.7 é ilustrada a interação de soro humano com biotina imobilizada no filme de ouro, com cobertura ($\theta_{bio} \approx 0,8$ ML), calculada aplicando-se o método já descrito para a ligação da biotina no ouro.

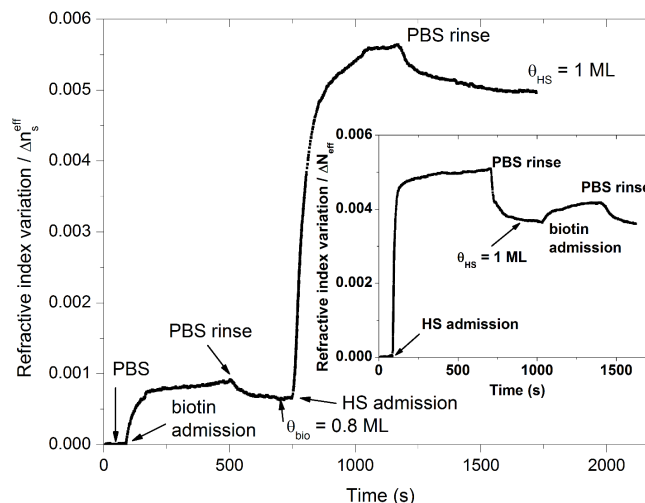


Figura 4.7: Evolução da alteração do índice de refração em função do tempo após a admissão de biotina seguida por admissão de Soro Humano (HS).

A evolução temporal da variação do índice de refração de HS de $4,310^{-3}$ RIU é causada por ligações irreversíveis, não específicas, dos constituintes de soro humano (diluído 1:10 em PBS) na

monocamada biotina (anterior), formando provavelmente uma monocamada simples. Existe uma ampla variedade de adsorventes potenciais dissolvidos em HS, tais como: diferentes proteínas, especialmente e em maior proporção, albumina humana; várias imunoglobulinas, lipoproteínas, hormônios e aminoácidos, ácidos de gordura, íons hidratados, glicose e vitaminas. Ligações irreversíveis destas proteínas séricas requerem que os seus grupos amina reajam com o grupo biotina-carboxila, enquanto que o único átomo de enxofre da biotina fornece a ligação com o substrato de ouro.

Na janela inserida na figura é representada a mesma evolução para a sequência invertida: primeiro, a admissão de HS seguida de admissão de biotina. São ilustrados o rápido aumento, quase vertical, da variação do índice de refração e rápido padrão de ligação do HS, respectivamente, com o filme fino de ouro puro. No entanto, parecem predominar ligações reversíveis, que são removidas após lavagem com PBS, porém não se pode afastar, por completo, a possibilidade de presença de ligações irreversíveis. Portanto, Neutravidina (NA) e soro humano, efetivamente, são imobilizados em uma monocamada de biotina. Na sequência reversa de ligação, biotina se liga firmemente também à NA, enquanto que a ligação da biotina ao soro humano (HS) precisa de uma análise mais detalhada.

Portanto, para realização de imunoenaios com o imunosensor SPR, nos quais se usa analito (antígenos, anticorpos) em HS, torna-se necessária uma camada de blindagem da superfície do filme de ouro, antes da introdução da camada de imobilização do ligante (anticorpos, antígenos), ou seja, antes da construção das camadas sanduiche (biotina-neutravidina-anticorpos biotinilados), para se evitarem ligações não específicas dos constituintes do HS no filme de ouro. Uma possível solução, nesse caso, é a utilização de uma camada de automontagem (SAM) mista de óxido de polietileno (tiol-PEO) com biotina. Por outro lado, a admissão secundária de anticorpos, como um reforço, após a admissão de HS com o analito, pode ampliar a informação de diagnóstico, melhorando a relação sinal/ruído, ou seja, ligações específicas versus ligações não específicas.

A análise das variações do crescimento da cobertura na adsorção da biotina é apresentada a seguir usando um modelo de aproximação do Langmuir por uma exponencial.

4.1.4 Análise de adsorção da biotina por aproximação do modelo de Langmuir por uma exponencial (AML)

A análise das taxas de crescimento da cobertura da biotina na adsorção na superfície, em função da concentração, pode ser efetuada usando o modelo de aproximação do Langmuir por uma exponencial. A partir dos dados medidos experimentalmente da evolução da cobertura para várias concentrações de biotina, já ilustrada na Figura 4.2, foram determinadas as derivadas em função do tempo (t) para se obter as taxas de crescimento $d\theta(t)/dt$ como mostrados nas Figuras 4.8, 4.9, 4.10.

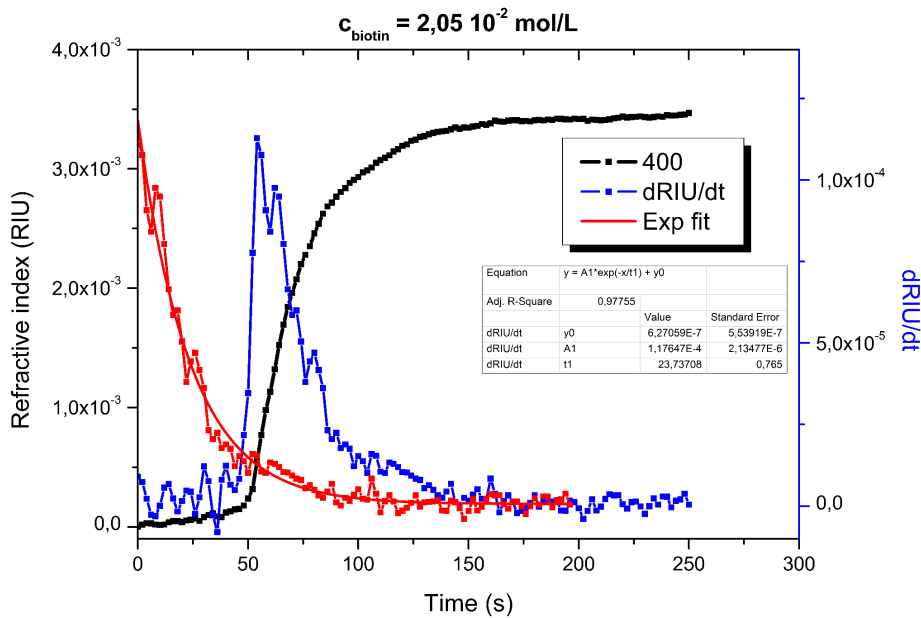


Figura 4.8: Gráfico com a curva da evolução da adsorção da biotina, a curva derivada da cobertura e aproximação dessa curva por uma exponencial, para uma concentração alta de biotina.

Conforme o modelo de adsorção de AML, já descrita no capítulo 2, neste trabalho, se a evolução temporal da taxa de crescimento, determinada experimentalmente, estiver de acordo com a equação (2.48) ($d\theta/dt = k_a(C)e^{-(k_a C)t}$) isto irá indicar validade de aplicação do modelo AML.

Pode-se afirmar, a partir dos gráficos mostrados, que de fato se verifica uma relação de aproximação, por uma exponencial decrescente, das derivadas das curvas do índice de refração em função do tempo, para as concentrações de biotina utilizadas. Pode-se concluir que, para moléculas pequenas (1nm) como a biotina, a aplicação do modelo de aproximação por uma exponencial,

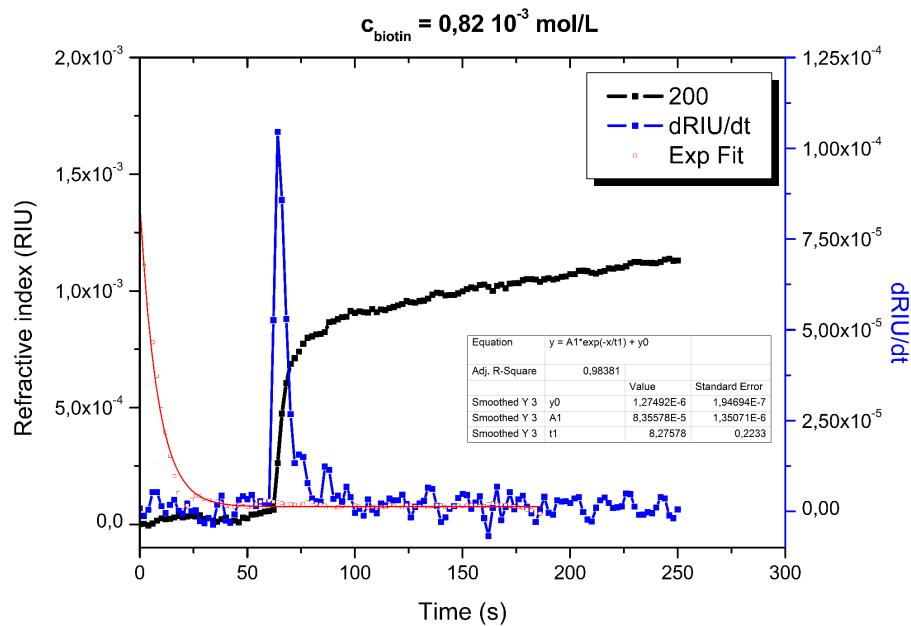


Figura 4.9: Curvas da evolução da adsorção da biotina, da derivada da cobertura e aproximação por uma exponencial, para uma concentração média de biotina.

adaptado do modelo de Langmuir, é perfeitamente válida.

4.2 Método para análise dos mecanismos de adsorção de proteínas globulares

Apesar do trabalho de pesquisa, ao longo de muitos anos, os mecanismos de ligações moleculares em substratos sólidos de macro-moléculas ligadas irreversivelmente, e em especial proteínas, não estão totalmente identificados e os modelos de adsorção disponíveis permanecem controversos [123]. Questões importantes sobre mecanismos complexos de ligações de proteínas precisam ser investigadas para se tentar identificar qual modelo de adsorção que melhor descreve esse processo de modo a se tentar reduzir as interferências de ligações não específicas; em especial quando se usa soro humano em imunoenaios para diagnósticos médicos.

A qualidade da cobertura da superfície pela proteína é um dos parâmetros importantes em imunoenaios. Regiões descobertas na superfície de detecção do sensor, ou seja, na superfície de ouro, podem gerar interferências por ligações não-específicas e, portanto, indicações falso-

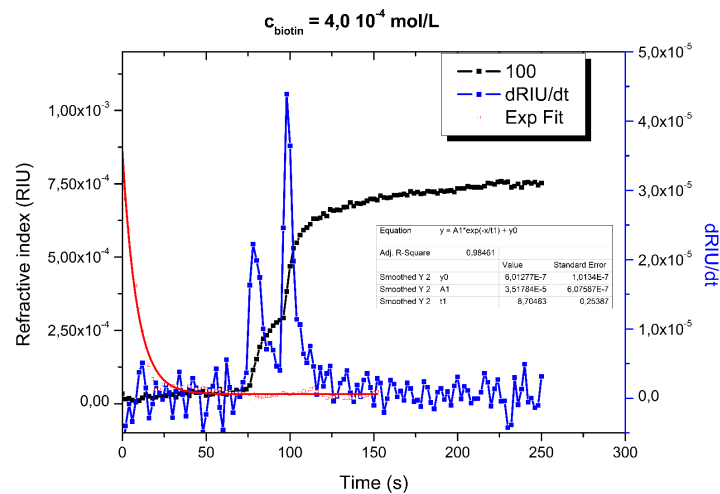


Figura 4.10: Curvas da adsorção da biotina, da derivada da cobertura e aproximação por uma exponencial para uma concentração baixa de biotina.

positivas. A otimização das condições de preparação e limpeza da superfície, concentração da proteína e orientação das moléculas, condições de fluxo, solvente ou tensão de polarização ajudam a otimizar a cobertura da proteína.

Nesse trabalho, foi feita uma tentativa de identificar os mecanismos dominantes de adsorção de proteínas globulares que têm estruturas semelhantes, embora diferentemente carregadas, em função da concentração de massa. Variando-se a velocidade do fluxo convectivo-difusivo e a concentração do analito, foram feitas avaliações quantitativas da evolução da cobertura da superfície pela proteína e da cinética das ligações de proteínas globulares como neutravidina, avidina e BSA. Foi analisada a influência da variação desses parâmetros, baseando-se no modelo de adsorção de Langmuir. O conceito aplicado, por monocamadas de Langmuir, é claramente ilustrado, e tem sido amplamente utilizado como modelo, para compreender o papel e a organização de membranas biológicas [84] e para a aquisição de conhecimento sobre o processo de reconhecimento molecular.

As características de adsorção de soro humano também foram incluídos nestas investigações. Este líquido fisiológico carrega uma multiplicidade de substâncias: proteínas globulares, como a albumina e glico-proteínas a partir de anticorpos em concentrações consideráveis, bem como traços de íons e de vários nutrientes e aminoácidos. Soro humano diluído, portanto, serve como um exemplo de um complexo líquido biológico, em que certos constituintes interferem e competem entre si durante a imobilização.

4.2.1 Métodos e materiais

O sistema imunossensor SPR, descrito aqui no capítulo 2, e em [26], foi utilizado neste trabalho para a monitorização óptica em tempo real dos transitórios de ligação de proteína e para uma determinação precisa da cobertura da superfície molecular correspondente $\theta(t)$, em combinação com uma forma modificada da isotérmica de Langmuir. Por ser SPR uma técnica de detecção altamente sensível e versátil é amplamente utilizada como uma ferramenta analítica em pesquisas bioquímicas [124].

O crescimento do filme de proteínas foi realizado pela admissão de soluções aquosas de proteínas, adequadamente selecionadas, fluindo continuamente durante um intervalo de tempo, sobre uma filme fino de ouro. Foi utilizada a célula microfluídica para suprimir qualquer impacto negativo da atmosfera ambiental. O tratamento apropriado da superfície metálica, na ausência de contaminantes da atmosfera ambiente, permite a manutenção do estado hidrofílico da superfície, ligações da proteína com reprodutibilidade e condições de equilíbrio. As características de adsorção/dessorção de imobilização de filmes de proteína, com ligações reversíveis e irreversíveis, na admissão de uma solução contendo proteína, como exemplo, são ilustradas na Figura 4.11. Em condições de estado estacionário, ligações reversíveis e irreversíveis podem coexistir. A lavagem da superfície por admissão de solução tampão ou água (sem proteína) irá remover as proteínas fracamente ligadas. Isso deixa apenas uma fração irreversivelmente ligada (Caso B). Esta se mantém, em geral, em ambiente seco e, eventualmente, um grupo de monocamada completa estável é formado. Na ausência de uma fração irreversivelmente ligada, a camada de proteína completa é removida (Caso C). Na ausência de uma fração ligada reversivelmente, a película formada inicialmente é totalmente retida (Caso A).

Uma camada fina de macromoléculas, que compreende uma espessura d_3 com índice de refração n_3 , liga-se ao filme fino de metal, e provoca um aumento adicional não linear com índice de refração de valor eficaz $\Delta n_s^{eff} = n_3 - n_4$. Para um filme monomolecular ideal, composto exclusivamente a partir de uma macromolécula espalhada homoganeamente com extensão molecular, d_m , o índice de refração máximo n_{mol}^{max} , resultante, é específico para esta molécula. Assim, se o valor do índice de refração eficaz medido for menor que o máximo, ou seja, $n_s^{eff} < n_{mol}^{max}$, então a camada molecular anexada será incompleta e não-homogênea. Esta característica é utilizada neste trabalho para a determinação da superfície de cobertura, medida em frações de mono-camadas, de

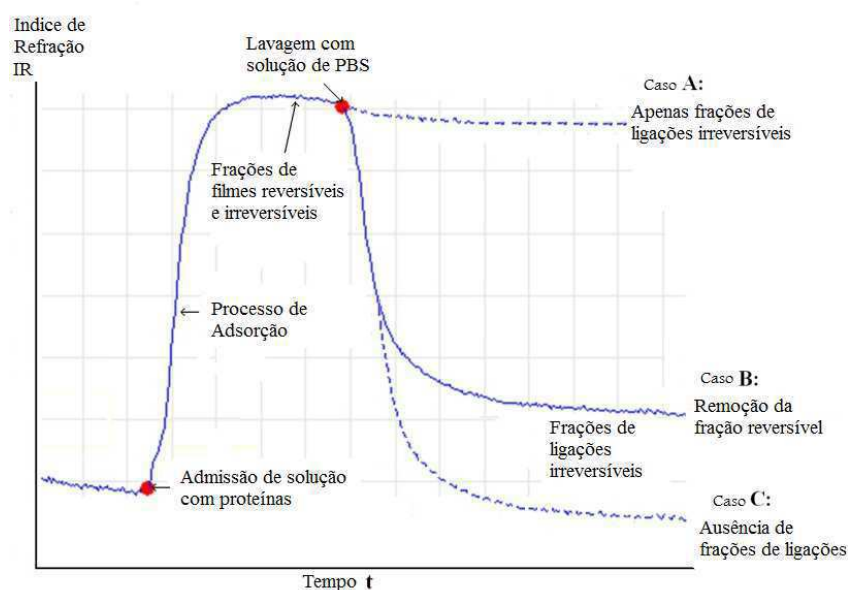


Figura 4.11: Ilustração das características de adsorção e desorção de immobilização de filmes de proteínas: Caso A - existência apenas de ligações irreversíveis. Caso B - remoção da fração reversível. Caso C - ausência de ligações.

forma semelhante ao método utilizado na análise da adsorção de biotina.

Todas as proteínas pesquisadas foram dissolvidas em solução tampão fosfato-salina (PBS), preparada a partir de água ultrapura nano-filtrada, (Millipore Direct-Q Sistema 3UV), compreendendo uma condutividade elétrica. A solução tampão foi preparada a partir de pastilhas pré-fabricadas de PBS (Medicago AG, Se) que continham 0,14 M de NaCl, 0,003 M de KCl e 0,010 M de fosfato de sódio-potássio. É importante notar que o PBS, por dissociação dos seus ingredientes, sal NaCl e KCl, nos seus respectivos íons, forma um eletrólito forte isotônico. A solução, portanto, apresenta um potencial eletroquímico e compreende uma elevada condutividade elétrica (com um pH de 7,23), à temperatura ambiente de 23°C. Imuno-avidina pura foi obtida da Sigma-Aldrich. Bloqueador BSA, bem como neutravidina imuno-pura, que é a forma deglicosilada de avidina, foram adquiridos da Pierce Inc. O soro humano foi obtido de um laboratório de análises clínicas.

Um *biochip* SPR polimérico, descartável, foi empregado para estes experimentos, coberto com película fina de ouro semi-transparente 50 nm e no ponto óptico de detecção. Aspectos da tecnologia de fabricação de *chips* SPR e física do método de detecção SPR são descritos em detalhe em [26]. A temperatura do instrumento foi mantida a $22,4 \pm 0,2$ °C ao longo do período de medição. O fluxo de admissão do analito foi fixado em $320 \mu\text{L}/\text{min}$, onde as condições de

fluxo laminar e uma concentração de proteína constante (isto é, $dC/dt = 0$) acima da superfície do filme fino de metal são mantidas. A célula de fluxo compreende um volume de $7 \mu\text{L}$. O tamanho do local de detecção é 1mm^2 , estando localizado no centro da célula de fluxo. O tempo de resposta do sistema e resolução temporal é de 2 s, em grande parte definido e limitado pelo sistema de aquisição de dados e software de processamento. O sinal de saída é a variação do índice de refração, a partir do momento da admissão de solução do analito sob consideração, e registrada como uma função do tempo. Com os valores conhecidos do tamanho da molécula do adsorvente molecular e do índice de refração associados, a cobertura do filme imobilizado é avaliada com boa precisão. Um protocolo, adequado para limpeza de superfície, aplicado ao filme fino de ouro do sensor provou ser crucial para manter a reprodutibilidade dos resultados. Limpeza efetuada dentro da célula de fluxo evitou contato com possíveis contaminações do ar ambiente. Vários ciclos iniciais de períodos de mais de 15 min com etanol (p.a.), concentrado NaOCl (pH 13) e enxágüe final de 5s com solução com H_2O_2 concentrado (pH 2,6) foi aplicado. A seguir PBS neutro foi admitido na célula de fluxo, durante 60 segundos, e estabelecido um estado de superfície hidrofílica estável, seguido por admissão da proteína contendo solução PBS. Atribui-se o estado hidrofílico à presença de uma única camada de íons Na^+ da solução PBS, fixados sobre a superfície do metal carregada negativamente. As condições de superfície foram controladas e verificadas pelo dispositivo SPR. A influência das condições de superfície iniciais é ilustrada na Figura 4.12.

Os transientes de adsorção de proteína são determinados para ambos, admissão imediata de neutravidina à superfície hidrofílica do ouro, e admissão após 5 minutos de exposição da superfície (pré-limpa) à atmosfera ambiente do laboratório. Isto conduz a um estado de superfície hidrofóbica, que exibe uma superfície de cobertura de proteína de cerca de 40% menor, em conjunto com uma cinética de ligação aparentemente mais lenta (como ilustrado na Figura 4.12).

4.2.2 Resultados parciais e discussão

Um conjunto representativo de transientes de adsorção foram determinados experimentalmente, e gravados, para concentrações decrescentes, de proteínas, em que a evolução da superfície de cobertura, $\theta(t)$, para uma filme de ouro, é representada em função do tempo. O diagrama para a avidina (Av) é mostrado na Figura 4.13, para a neutravidina na Figura 4.15, para BSA na Figura

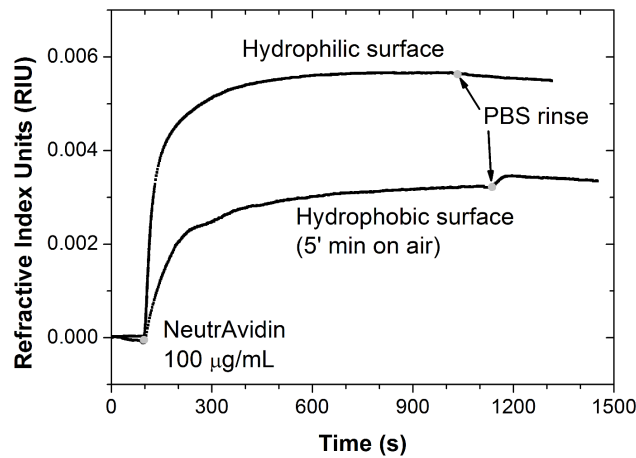


Figura 4.12: Transientes de adsorção de proteína imediatamente após admissão da Neutravidina à superfície de ouro hidrofílica, previamente limpa, e após 5 min de exposição da superfície (pré-limpa) à atmosfera ambiente.

4.17 e para SH na Figura 4.19. Um conjunto de características de crescimento de filme para essas proteínas e também para soro humano, é apresentado a seguir. A isoterma de equilíbrio de Langmuir em função da concentração, $\theta(C)$, foi obtida pela média de três conjuntos de dados. Assim como o inverso da isoterma correspondente θ^{-1} em função de C^{-1} , permitindo a determinação das constantes de ligação, em equilíbrio, correspondentes e cobertura por extensão assintótica. Foram determinadas as constantes de adsorção/dessorção, k_a e k_d respectivamente, em função da concentração de proteína. Os valores de equilíbrio de $\theta(t)$ foram medidos, após a lavagem final de PBS para remover a fração de moléculas ligadas reversivelmente. As constantes de equilíbrio, K_{eq} e energias de ligação associadas, $-\Delta G$, foram determinadas, e indicadas nos gráficos individuais, para cada proteína e soro humano.

Avidina (Av)

Esta proteína globular, avidina (Av), é mais conhecida por sua capacidade de se ligar, de forma irreversível à biotina. A avidina é um tetrâmero, com quatro domínios de ligação idênticos para a biotina. Ela é um componente essencial para a criação de uma determinada classe de biossensores que utilizam substratos e/ou adsorventes biotinilados.

Após a dissolução na solução neutra tampão PBS, a faixa de concentração, de moderada a alta, de moléculas de proteína Av, compreende uma carga líquida positiva alta. Estas, portanto,

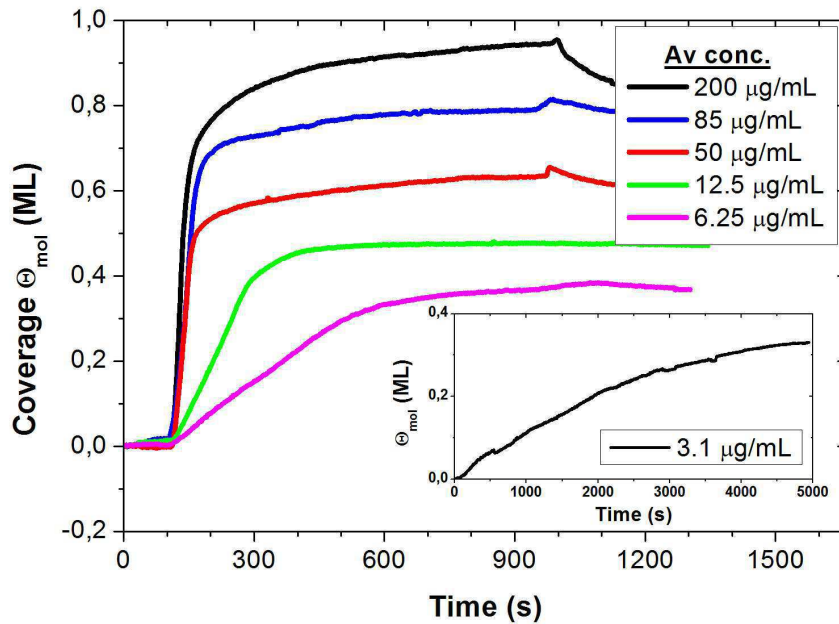


Figura 4.13: Diagrama das características de adsorção e desorção de avidina na superfície de ouro em função do tempo para diferentes concentrações.

são eletro-estaticamente atraídas pela superfície com o filme de ouro, negativamente polarizado. Na direção de menor concentração de proteína Av, a atração eletrostática diminui e a polarização muda de sinal. Após lavagem com PBS as moléculas adsorvidas, parcialmente carregadas, são repelidas, uma vez que o potencial de circuito aberto (OCP) aumenta. O período de tempo, para que seja estabelecido o equilíbrio, varia de 300s para altas concentrações de proteína, até mais de 6000s para baixas concentrações. Em $t \cong 1000s$ e em condições de equilíbrio, a superfície metálica é lavada com solução PBS. Na maior concentração de avidina, uma fração de cerca de 15% de moléculas, ligadas reversivelmente, é removida. A quantidade dessas moléculas, fracamente ligadas, diminui constantemente com a C . Para $C < 1\mu \text{ mol/l}$, a imobilização de proteínas Av ocorre apenas em um estado de ligações irreversíveis.

A adsorção isotérmica do modelo de Langmuir convencional, extraída das transientes em condições de equilíbrio, é representada na Figura 4.14.

Nesta figura é mostrada a evolução de cobertura θ , em equilíbrio, após lavagem com PBS e remoção das moléculas fracamente ligadas, em função da concentração de proteína. Uma clara descontinuidade foi observada em $C \approx 1\mu \text{ mol/L}$. A representação inversa θ^{-1} em função de C^{-1} é ilustrada na janela. A presença de uma variação linear e inclinação constante de $1/K_{eq}$,

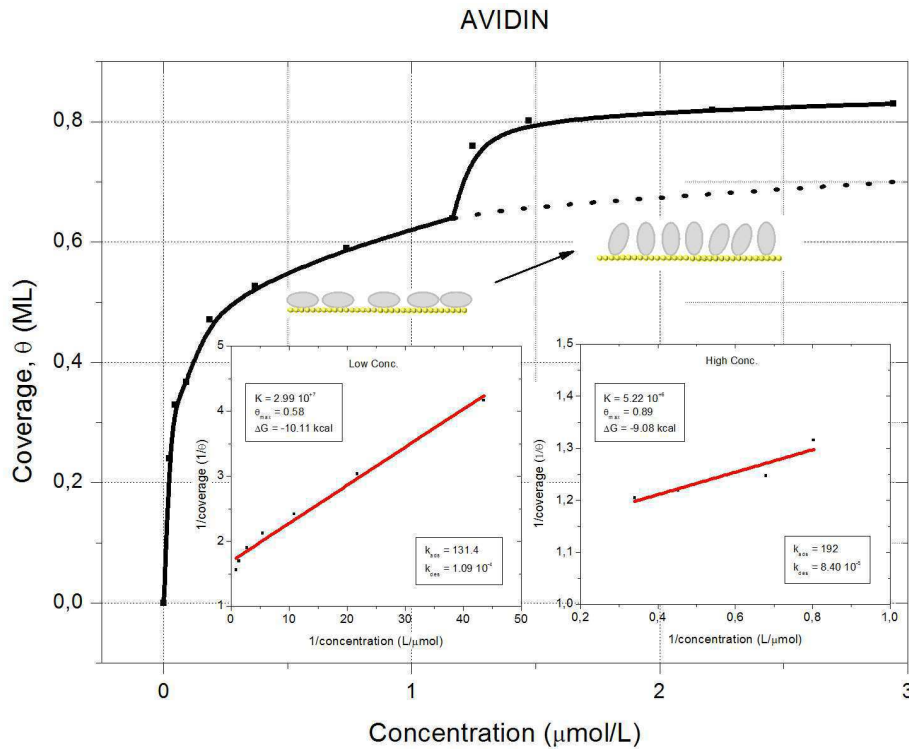


Figura 4.14: Diagrama da cobertura de avidina na superfície de ouro em função da concentração.

é a comprovação para validação do modelo de adsorção de Langmuir de acordo com a equação $1/\theta = (1/K_{eq}C) + 1$.

Dois estados diferentes de ligação para a avidina: em altas concentrações da proteína e para baixas concentrações são identificadas na análise termodinâmica. Os resultados são apresentados na janela na Figura 4.14, em que $(1/\theta)\text{mol}$ é representada em função da inversa da concentração molar $1/C$. Os parâmetros de ligação são indicados nas duas janelas inseridas na Figura 4.14: o limite de saturação (*jamming*) da cobertura de superfície em baixa concentração $\theta_{max} = 0,580,05 \text{ ML}$. Além disso, em alta C, saturação de cobertura no limite $C \rightarrow \infty$ aumenta substancialmente a $\theta_{max} = 0,890,05 \text{ ML}$. As constantes cinéticas relacionadas com a baixa C foram determinadas como indicado na janela da Figura 4.14. As margens de erro associadas são cerca de 40%. Além disso, as energias de ligação molecular apresentam os seguintes valores: à baixa C, $\Delta G = -10,110,4 \text{ kcal/mol}$. Em alta concentração, esta quantidade diminui para $\Delta G = -9,080,21 \text{ kcal/mol}$.

Neutravidina (NAv)

Neutravidina é a forma deglicosilada da avidina, onde a fração do carboidrato é removida da molécula, enquanto a estrutura molecular permanece praticamente inalterada. A sua característica de ligação com a biotina é semelhante a da avidina. Porém, esta proteína é considerada muito menos sensível aos efeitos de ligações não-específicas. Assim esta tem uma importância equivalente para os biossensores que se baseiam na biotina como um ligante molecular. Transientes de adsorção representativos para diferentes concentrações da Neutravidina são mostrados na Figura 4.15.

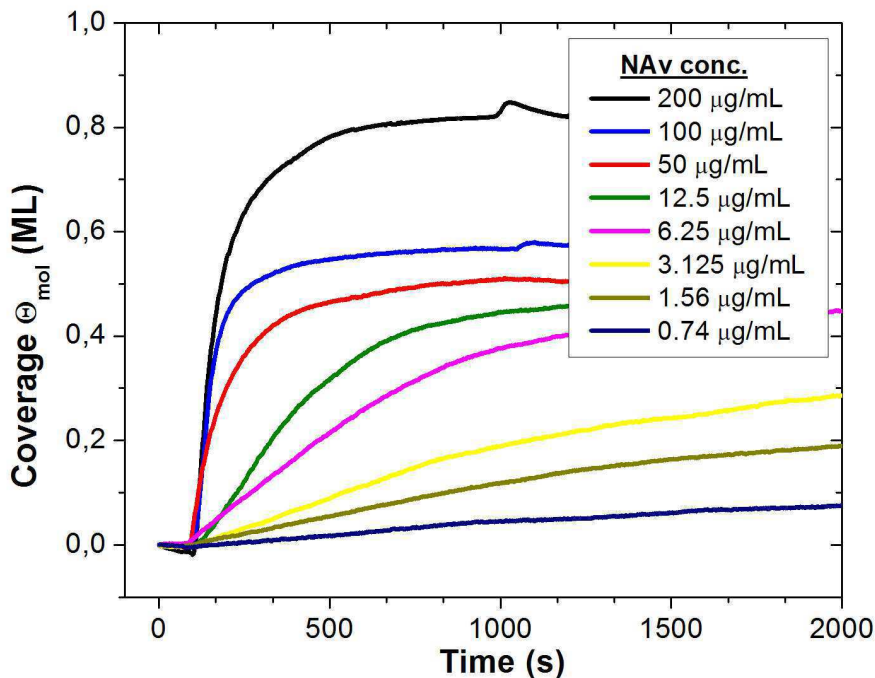


Figura 4.15: Diagrama de adsorção e desorção da Neutravidina na superfície de ouro em função do tempo para diferentes concentrações.

Lavagem da superfície com PBS é realizada em $t = 1.000$ s. Em comparação com a avidina, a neutravidina revela um nível muito baixo de moléculas imobilizadas reversivelmente, para altas concentrações de proteína. A isotérmica de adsorção, $\theta(C)$, determinadas a partir das transientes, é apresentada na Figura 4.16.

Semelhante à avidina, uma clara mudança de inclinação ($d\theta/d(C)$) é observada em $C > 0,5$ mM/L, indicada pela linha pontilhada vertical. Mais uma vez, dois estados diferentes de ligação: em altas concentrações da proteína e para baixas concentrações, e são identificadas na análise

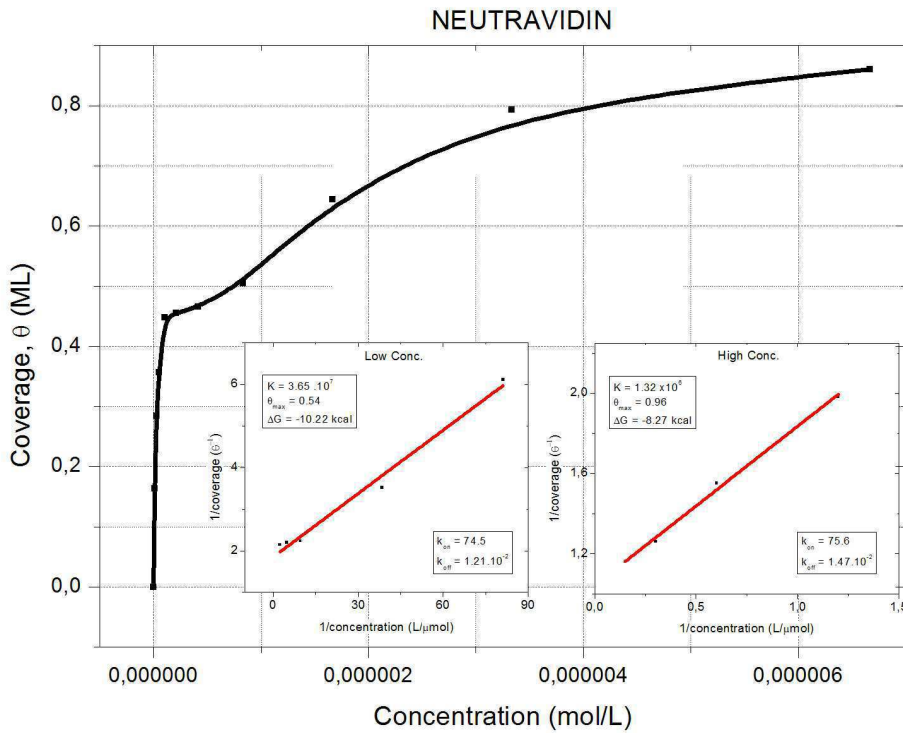


Figura 4.16: Diagrama da cobertura de neutravidina na superfície de ouro.

termodinâmica. Os resultados são apresentados na janela na Figura 4.16, em que a cobertura inversa ($1/\theta$)mol é representada em função da inversa da concentração molar $1/C$. Os parâmetros de ligação são indicados nas duas janelas inseridas na Figura 4.16: o limite de saturação (*jamming*) da cobertura de superfície em baixa concentração $\theta_{max} = 0,540,05$ ML. Além disso, em alta C, saturação de cobertura no limite $C \rightarrow \infty$ aumenta substancialmente a $\theta_{max} = 0,960,05$ ML. As constantes cinéticas relacionadas com a baixa C foram determinados como indicado na janela da Figura 4.16. As margens de erro associadas são cerca de 40%. Além disso, as energias de ligação molecular apresentam os seguintes valores: à baixa C, $\Delta G = -10,220,4$ kcal/mol. Em alta concentração, esta quantidade diminui em 1,95 kcal/mol para $\Delta G = -8,270,21$ kcal/mol.

Albumina de soro bovino (BSA)

Chamada de proteína globular, a estrutura molecular de BSA é comparável à avidina e neutravidina. Após a sua dissolução em tampão PBS neutro, as moléculas tornam-se carregadas negativamente. Eles são assim atraídas para a superfície do metal em caso de polarização anódica, assim como após a lavagem com solução tampão. No entanto, ao contrário da Av e Nav, a molécula de

BSA transporta 17 grupos di-sulfureto, que são capazes de interagir quimicamente com o substrato de ouro, de preferência, através da ligação Au-S. Um conjunto de transientes de adsorção, para concentrações decrescentes de proteína, é mostrada na Figura 4.17.

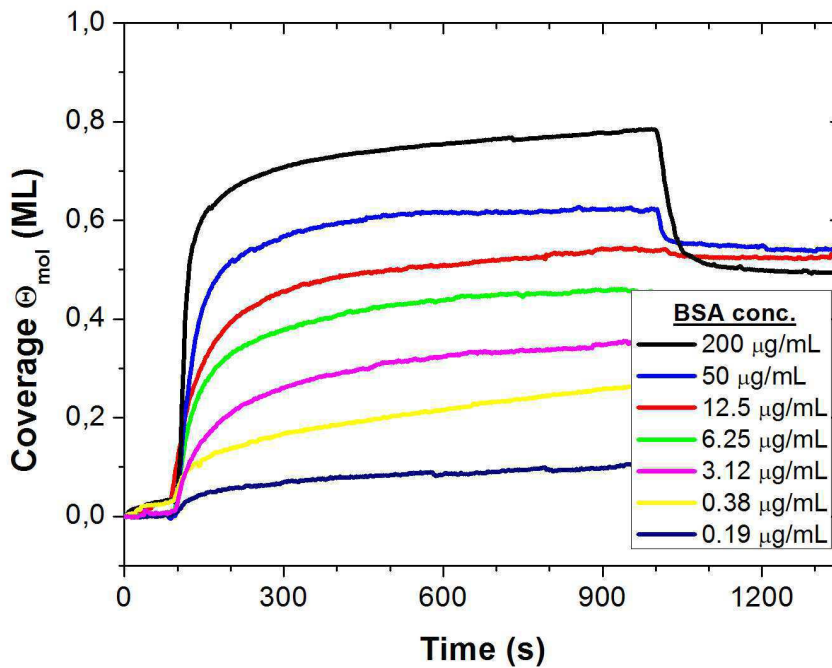


Figura 4.17: Diagrama das características de adsorção e desorção de BSA na superfície de ouro em função do tempo para diferentes concentrações.

Lavagem da superfície com o tampão PBS simples é realizada em $t = 1.000s$. Em altas concentrações, uma grande fração das moléculas, fracamente ligadas, persiste na superfície, enquanto que para $C < 3,12 \mu\text{g/ml}$ de proteínas, só ligações irreversíveis são observadas. Mais evidente no diagrama de Langmuir, na Figura 4.18, é a diminuição da cobertura de superfície para uma maior C .

A validade da abordagem por isoterma de Langmuir é, portanto, restrita às concentrações de avidina de $C < 2 \mu\text{mol/L}$. Os parâmetros de ligação estão indicados na janela inserida na Figura 4.18, da seguinte forma: o limite (*jamming*) da cobertura de superfície em baixa concentração $\theta_{max} = 0,550,05mL$. Além disso, para altas C , no limite $C \rightarrow \infty$, os aumentos de cobertura de saturação para $\theta_{max} = 0,840,05mL$. As constantes cinéticas relacionados em baixas C e para altas C foram determinadas e estão indicadas na janela inserida na Figura 4.18. As margens de erro foram determinados em cerca de $\pm 40\%$. Além disso, a energia de ligação molecular foi

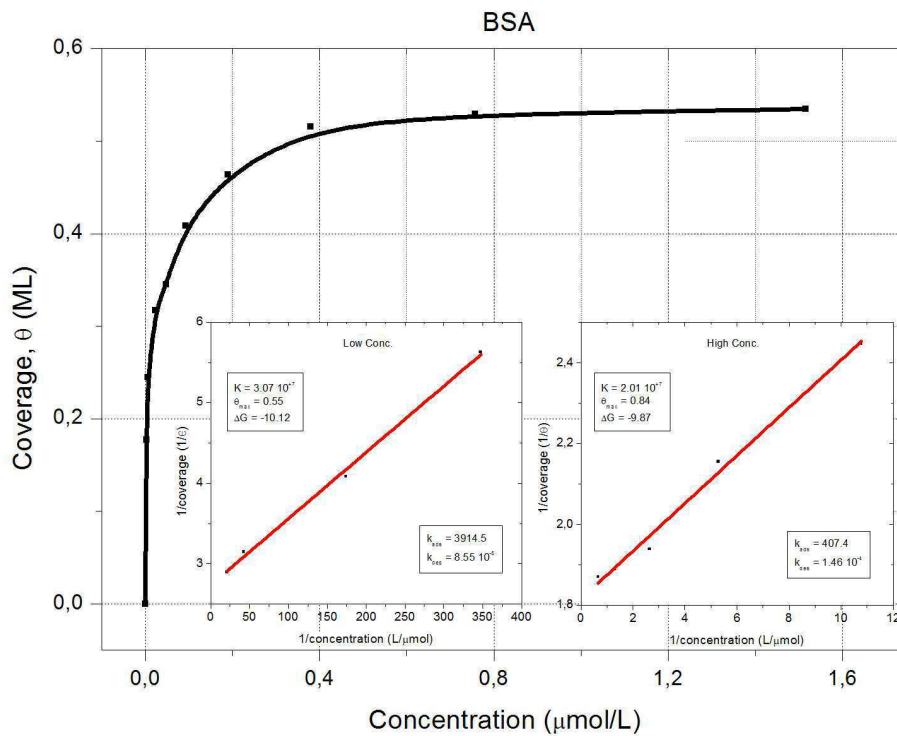


Figura 4.18: Diagrama das características de adsorção e desorção de BSA na superfície de ouro.

determinada como $\Delta G = -10,12 \pm 0,4$ kcal/mol em baixas C, enquanto um decréscimo foi gravado em concentrações elevadas $\Delta G = -9,87 \pm 0,21$ kcal/mol.

Soro humano

O comportamento da adsorção de líquidos corporais, especialmente do soro humano, apresentam uma tendência para efeitos de ligação não específicos pronunciados, podendo, muitas vezes, limitar a adequação de algumas configurações de ensaios. Conforme já mencionado, o soro humano é largamente composto de albumina do soro, bem como de várias glico-proteínas, além de uma grande variedade de outros constituintes presentes, porém em concentrações muito pequenas. Devido à elevada concentração de albumina de 44 ± 8 g/L, o soro humano em solução PBS se comporta de forma mais semelhante a BSA. Um conjunto de amostras representativas de transientes de adsorção em diferentes concentrações de proteína está mostrado na Figura 4.19.

Em altas concentrações, a cobertura de superfície inicial é ligeiramente menor que a de uma única mono-camada. Lavagem da superfície com o tampão PBS simples em $t = 1000$ s remove uma grande fração das moléculas fracamente ligadas. No intervalo $C < 1,8$ $\mu\text{g/ml}$, apenas as

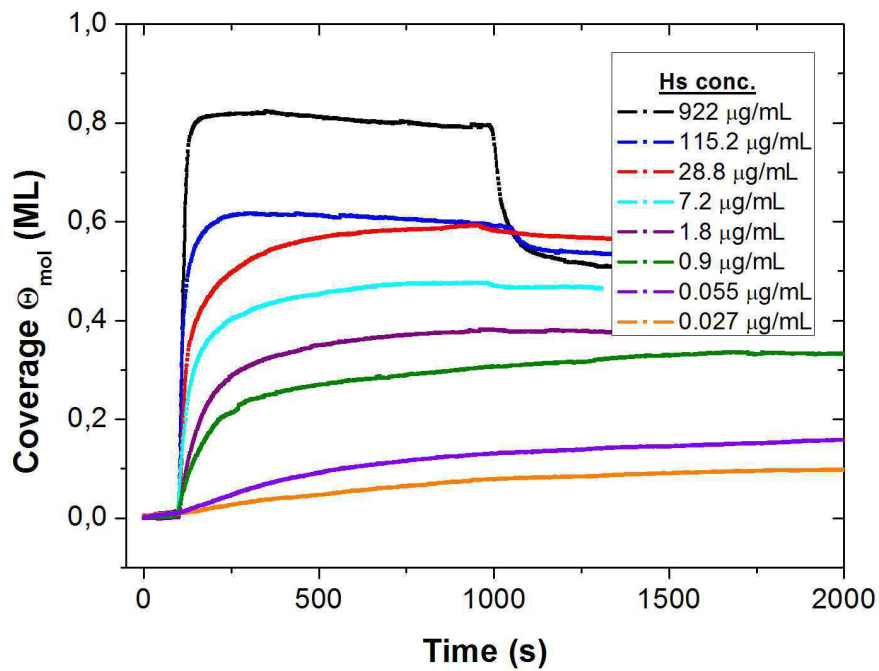


Figura 4.19: Diagrama das características de adsorção e desorção de soro humano na superfície de ouro em função do tempo para diferentes concentrações.

proteínas irreversivelmente imobilizadas permanecem ligadas à superfície. Mais pronunciada no diagrama de Langmuir Figura 4.20d é a aparência de uma oscilação na cobertura de superfície e um mínimo distinto de $C \approx 2,2 \mu\text{mol/L}$.

Por isso, a validade da abordagem de Langmuir é restrita às concentrações $C < 0,5 \mu\text{mol/L}$, a qual exibe uma inclinação $d\theta/dC$ positiva.

A adsorção do soro humano também é devida a dois diferentes estados de ligação para análise termodinâmica. O resultado é apresentado na janela, mostrando uma variação linear da cobertura inversa $1/\theta$ em função da concentração molar inversa $1/C$ numa faixa de concentração reduzida. Os parâmetros de ligação estão indicados na janela da seguinte forma: o limite de *jamming* da cobertura de superfície em baixa concentração é $\theta_{max} = 0,40 \pm 0,07 \text{ mL}$. Além disso, para altas C , no limite $C \rightarrow \infty$, a cobertura aumenta para $\theta_{max} = 0,58 \pm 0,07 \text{ mL}$. As constantes cinéticas relacionadas para baixas C são determinados como $K_a = 5,27 \times 10^5 \text{ l/mol/s}$ e $K_d = 9,79 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Em altas concentrações de proteína estas quantidades mudam para $K_a = 1,34 \times 10^5 \text{ l/mol/s}$ e $K_d = 2,94 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. As margens de erro foram determinados em cerca de $\pm 60\%$. A energia de ligação molecular foi determinada como $\Delta G = -11,99 \pm 0,5 \text{ kcal/mol}$

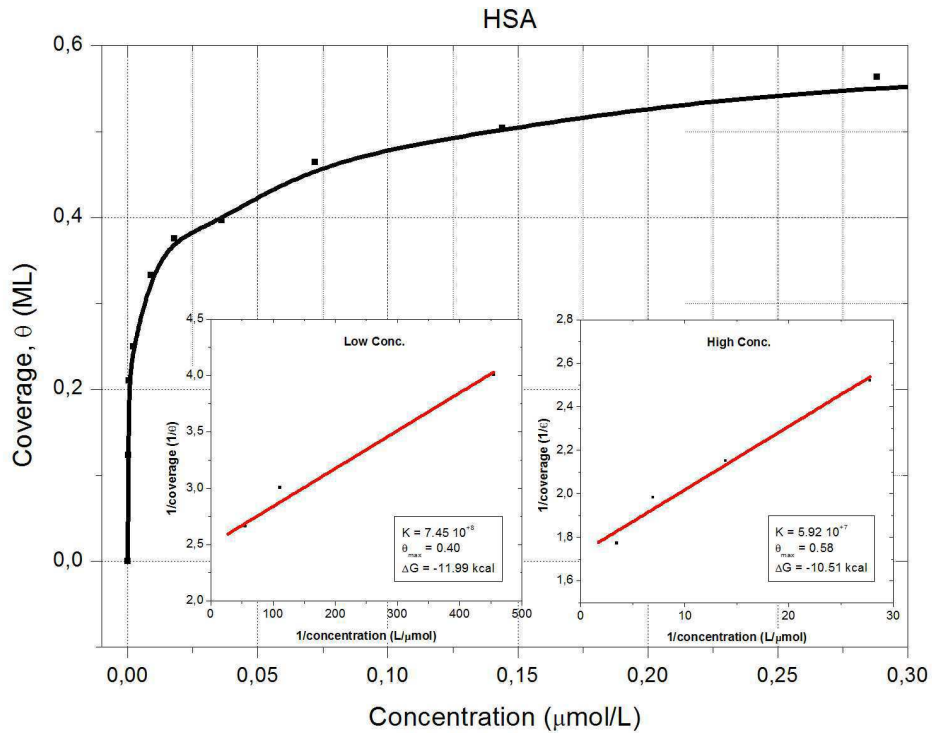


Figura 4.20: Diagrama das características de adsorção e desorção de soro humano na superfície de ouro.

para baixas C , enquanto uma diminuição para $\Delta G = -10,51 \pm 0,25$ kcal/mol foi mostrada para concentrações elevadas. Parâmetros de ligações representativas para as proteínas em questão são apresentadas em [119], [101], [125]. Enquanto energias de ligação ΔG são semelhantes para todas as proteínas da amostra (≈ 11 kcal/mol para alta C e $\approx 9,5$ kcal / mol para baixas C , grandes diferenças foram evidenciadas entre as constantes cinéticas k_a e k_d .

Conclusões parciais

Neste método experimental a avaliação da cobertura molecular da superfície na adsorção de substâncias como proteínas globulares, importantes no desenvolvimento dos imunoenaios, foi efetuada de forma independente e não está acoplada a algum modelo já conhecido de adsorção. Foram usados modelos matemáticos conhecidos para tentar quantificar e analisar os resultados dos experimentos. O método experimental foi aplicado inicialmente à ligação de biotina no ouro, sendo esta uma macromolécula orgânica e bastante útil na tecnologia de imunoenaios. Antes da preparação das camadas de imobilização foi feita uma limpeza de modo a se obter uma superfície hidrofílica o que melhora a eficiência da cobertura. A configuração da célula de fluxo utilizada

é especialmente projetada para evitar contaminação do meio ambiente e assim conservar a propriedade hidrofílica da superfície. A diferença entre os dois estados de superfície (hidrofílica e hidrofóbica) foi evidenciado por experimentos e ilustrado na Figura 4.12 e têm uma diferença na relação de cobertura de um fator de 2 entre os mesmos. Um resultado preliminar observado com os experimentos é que a cobertura das monocamadas de proteínas nunca é completa, ou seja, $\theta < 1$, para praticamente todas as concentrações de proteínas disponíveis. Portanto, a cobertura máxima raramente excede a 0,8 da monocamada completa. Os modelos de Langmuir e formas modificadas da Isoterma de Langmuir são ferramentas amplamente usadas com sucesso em muitos estudos de adsorção macromoleculares e de proteínas. As aplicações desses métodos permitem analisar e quantificar condições com o objetivo de otimizar o desempenho dos imunossaios. Os resultados obtidos estão dentro da faixa de dados já publicados anteriormente nas referências (7-10 e 13) que também usaram isotermas de Langmuir e de Freundlich nos quais as energias de ligação determinadas variam entre -4,8 a -16 kcal/mol. Os parâmetros cinéticos como limites de saturação e constantes de adsorção e dessorção, k_a e k_d , foram calculados. Poucos trabalhos fornecem avaliações quantitativas da cobertura e de constantes cinéticas. A validade da isoterma de Langmuir requer que a constante de equilíbrio, K_{eq} , varie exponencialmente com a energia de ligação $-\Delta G$ e que seja independente do sistema de adsorção específico. Os resultados obtidos nesse trabalho satisfazem claramente essa condição. Como foi utilizado um dispositivo microfluídico com fluxo de proteínas constante e admissão contínua da solução, não há variação da concentração, $dC/dt=0$. E como não há um gradiente vertical de concentração, ou seja, $dC/dz=0$, podem-se desprezar os efeitos de transporte por difusão para a superfície de ouro.

4.3 Prova de conceito do método de diagnóstico e identificação do vírus dengue

Como exemplo do estudo de adsorção foi proposto um método para realização de imunossaios para a detecção e identificação do antígeno, vírus da dengue (DENV). A partir da análise e estudo da biotina e proteínas (avidina, neutravidina e BSA) foi implementada uma configuração, baseada na forte afinidade entre a biotina e a avidina, para a imobilização do anticorpo monoclonal anti-dengue (Mab-DENV) na superfície do sensor SPR.

4.3.1 Motivação e relevância do método

Anualmente são registrados inúmeras epidemias de dengue no mundo, com ocorrências fatais, devido ao vírus da dengue. A maioria destas epidemias ocorre em regiões mais quentes, como nos trópicos e sub-trópicos, onde se situa o Brasil. Isto inclui todos os países da América do Sul, bem como Índia, China, Vietnã, Camboja, na Ásia, Ilhas do Pacífico, e todos os países Africanos. Todos juntos totalizam mais de 3 bilhões de pessoas no mundo, para as quais as epidemias de dengue são uma ameaça constante. Com o fenômeno de aquecimento global as regiões afetadas estão em expansão crescente. Apesar disso, não existe ainda tratamento específico para essa doença [90]. O único meio de prevenção é através da vigilância e controle de vetores. Formas graves da infecção podem ser fatais, e como não há terapêutico eficaz atualmente disponível, a detecção precoce é importante para ajudar com a gestão clínica dos sintomas [14].

O vírus da dengue é transmitido pelos mosquitos *Aedes Aegypti* e *Aedes Albopictus*, pertencentes à família Flaviviridae. São quatro os tipos de vírus DENV(1,2,3,4) até agora oficialmente identificados (e um DENV5 recentemente descoberto mas não oficialmente reconhecido), e estes diferem em sua atividade antigênica. A infecção se manifesta de formas variadas numa faixa que abrange desde a forma mais branda, semelhante a uma gripe, conhecida como febre da dengue (FD) até formas mais graves como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD), com altas taxas de mortalidade [14]. A infecção primária confere imunidade protetora ao longo da vida contra o sorotipo infectante, mas não provê a proteção cruzada contra qualquer um dos outros sorotipos. A ocorrência de FHD e de SCD é mais provável numa infecção secundária, quando envolve exposição a um sorotipo diferente do primeiro [68], [90] e [91]. Desta maneira, a distribuição geográfica dos sorotipos DENV,(com exceção do tipo 5, ainda restrito a uma pequena região selvagem) em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, levou a surtos de maior amplitude e maior gravidade. Portanto, para se evitar a mortandade, e se ter um controle epidemiológico eficaz da doença, a detecção do vírus e a sorotipagem são fundamentais, logo no início, quando aparecem os primeiros sintomas, para que se tomem os cuidados médicos adequados e imediatos, principalmente nos casos mais graves, quando ainda é possível se evitar consequências maiores. Se a doença se desenvolve, o tratamento precoce muitas vezes salva vidas, e este, por sua vez, depende de encontrar o diagnóstico correto e rápido. A presença de vírus, assim como dos respectivos anticorpos correspondentes, produzidos pelo sistema imunoló-

gico, pode ser usada para diagnosticar, inequivocamente, uma infecção. A presença do DENV, detectável, tem sido observada no soro, saliva e urina [68]. Porém, a detecção do DENV é crítico em relação ao tempo: na fase inicial febril, que geralmente dura de 3 a 7 dias, a concentração do vírus é alta. Depois de alguns dias (geralmente mais de três a cinco dias), devido à resposta imunológica do corpo, ela cai abaixo de quantidade detectável, enquanto que as concentrações de anticorpos DENV específicos, IgG e IgM, aumentam. As técnicas usuais de identificação da dengue a partir dos anticorpos DENV, utilizadas atualmente em laboratórios clínicos, aos quais a população tem acesso, requerem cinco dias ou mais, depois de aparecerem os primeiros sintomas, depois que a doença já se instalou com todas as consequências, muitas vezes, graves. O diagnóstico precoce, preciso e eficiente da doença é muito importante na definição dos cuidados clínicos, estudos de patogenia e pesquisa de vacinas. Além disso, um diagnóstico eficiente é uma importante ferramenta para apoiar programas de vigilância epidemiológica, considerando as dificuldades em confirmar casos de dengue, com base apenas nos sintomas clínicos, especialmente durante períodos inter-epidêmicos.

4.3.2 Objetivo

Propõe-se, aqui, implementar uma prova de conceito de um método de detecção do vírus dengue utilizando-se o dispositivo microfluídico baseado na tecnologia SPR. Inicialmente é feita a preparação da superfície sensível, com a fixação dos anticorpos anti-dengue (Ab), para indicação, sem marcadores, da presença de um complexo antígeno-anticorpo (Ab-Ag), onde a mudança de espessura, na superfície sensível, é medida e gravada. Ao fazer passar o sangue diluído (ou soro) pela célula de fluxo do sistema, poderá se detectar o DENV, e se possível, identificar o tipo de vírus (sorotipagem), em tempo real. A observação da influência da temperatura na medição do índice de refração, que é o sinal de saída utilizado do sensor SPR, também é muito importante para que se implemente a compensação adequada no resultado da medição. Para análise da superfície do *chip*, onde estão ligados os anticorpos e os vírus, utilizou-se um microscópio de força atômica (AFM), a exemplo do que foi feito em [126], para investigação das várias camadas de ligação específicas e as possíveis camadas não específicas, que poderiam interferir na detecção do vírus.

4.3.3 Descrição do método proposto

Para implementar a prova de conceito do método de detecção desenvolvido com esse dispositivo, utilizou-se um sensor SPR por medição direta, sem marcadores, para detectar ligações específicas de um antígeno com os anticorpos correspondentes, através do aumento da espessura da massa (de cobertura) da camada de detecção, devido à formação do complexo antígeno-anticorpo. A especificidade e a sensibilidade da interação antígeno-anticorpo determinam a seletividade e a sensibilidade do imunossensor, assim como a possibilidade de regeneração.

Para alcançar a sensibilidade adequada é necessário que o complexo tenha uma afinidade alta, sendo difícil a sua dissociação, sendo assim, idealmente, um sistema de utilização única, descartável, ou de uma boa capacidade de regeneração. Para atender a essas especificações a estrutura do Imunossensor foi definida, quanto ao elemento catalizador e quanto ao transdutor, da seguinte maneira:

1) Quanto ao biocatalisador:

Como o objetivo do detector é a sorotipagem, ou seja, a capacidade de reconhecer especificamente cada tipo DENV(1,2,3,4), a característica a ser enfatizada, para este imunossensor, é a especificidade e afinidade, entre o antígeno e o anticorpo. Para isso foram utilizados anticorpos monoclonais, específicos para cada tipo de vírus dengue, como agente biocatalizador. As moléculas monoclonais são idênticas e possuem a mesma especificidade. Ao contrário dos anticorpos policlonais que são populações complexas de anticorpos que reconhecem diferentes regiões do antígeno, possuindo maior sensibilidade, porém, menor especificidade.

2) Quanto ao transdutor:

Foi utilizado o sensor óptico SPR (descrito no item 3.3) no qual é acoplado um *biochip* polimérico, para monitoramento, em tempo real, da detecção direta dos DENV por formação do complexo MAB-DENV(1,2,3,4) a partir da amostra de sangue (soro) do paciente. A escolha do sensor SPR, (já descrito no cap.3), se deve ao fato de este ser altamente sensível a eventos químicos, como na reação antígeno-anticorpo, que ocorre na superfície do sensor, numa vizinhança bem limitada, de algumas centenas de nanômetros, o que viabiliza a resolução precisa do sensor SPR. Este sensor ainda tem a vantagem de poder monitorar os eventos químicos em tempo real, por detecção direta, sem marcadores (tipo enzimas ou corantes), evitando, assim, interferências de componentes externos. A alta especificidade (baixa avidéz) dos anticorpos monoclonais permite

a utilização do sensor SPR como imunossensor.

Para explicar o funcionamento do imunossensor, na Figura 4.21 é mostrado um diagrama, com a célula de fluxo e o sensor óptico SPR. A amostra de sangue do paciente (soro diluído), ao ser admitido, flui sobre a superfície de detecção funcionalizada. O antígeno DENV, se estiver presente na solução, vai ser anexado à camada mais externa imobilizada de anticorpos (MABBi). Em realce, é ilustrada a camada de detecção com anticorpos fixados e as ondas de superfície do campo evanescente.

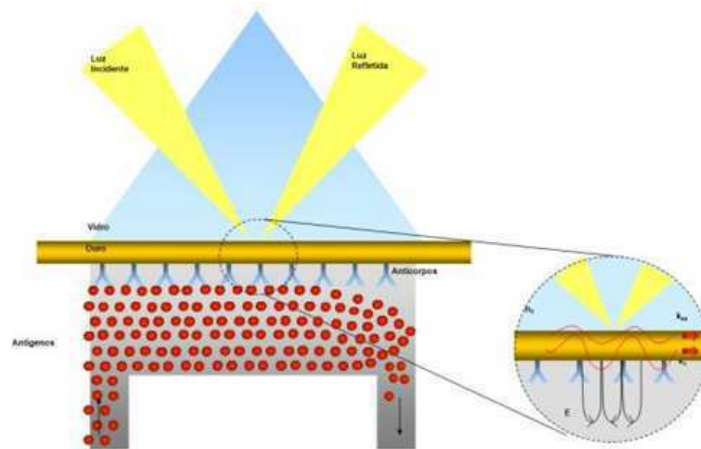


Figura 4.21: Diagrama do Imunossensor com o analito na célula de fluxo. No realce a camada de detecção com anticorpos imobilizados onde serão ligados os antígeno DENV que estiverem presentes.

Na superfície do substrato polimérico coberto com ouro puro é imobilizado o agente catalizador que irá se ligar ao analito a ser detectado. Essa camada é chamada de superfície de detecção, S. Essa superfície S, desse sistema imunossensor, é composta de camadas para imobilização dos anticorpos anti-dengue (MAB-IgG).

Princípio do imunoensaio

O imunoensaio para detecção do vírus dengue, proposto neste trabalho, compreende um arranjo de quatro camadas, e se baseia na forte ligação avidina-biotina. Os anticorpos monoclonais anti-dengue IgG (MAB-IgG) são conjugados com biotina para serem imobilizados. O sistema biotina/avidina é usado para implementar a fixação dos anticorpos na camada de ouro. Primeiramente uma mono camada auto-organizada (SAM) com biotina sulfonada (Sulfo-NHS-S-S-Biotina) é fixada no ouro. Em seguida a avidina é fixada na superfície de ouro, por meio dessa monocamada

auto-organizada (SAM-SB), por ligações covalentes. Foi utilizada a NeutrAvidina NA, que é a avidina deglicosilada. A avidina serve como uma ponte molecular entre o antígeno biotinilado específico acima (MABbi) e o substrato SAM-SB. Essa monocamada (SAM-SB) funciona como um braço de modo a evitar impedimento estérico. Cada molécula de avidina contém 4 locais de ligação para a biotina e, por outro lado, anticorpos podem ser conjugados com várias moléculas de biotina. Esta interação permite uma boa sensibilidade do teste. Para a preparação do ligante que consiste na conjugação dos anticorpos com biotina (biotinização), há vários kits comerciais com procedimentos de preparação disponíveis. Na realização de imunoenaios, que utilizam a tecnologia SPR, para que se obtenham bons resultados, são importantes as seguintes etapas [51] :

- Escolha e colocação adequada do *chip* de medição.
- Funcionalização adequada e eficiente da superfície sensora do *chip* polimérico
- Lavagem adequada da superfície (antes da imobilização).
- Composição de buffers que mantenham a estabilidade do analito
- Procedimentos de imobilização eficientes
- Condições de regeneração e de armazenamento dos *biochips*

Funcionalização da superfície sensora

O método de funcionalização da superfície sensora em camadas tipo sanduíche, para detectar o complexo antígeno-anticorpo, consiste em um arranjo tipo camada sendo baseado, na presente aplicação, no forte padrão de ligação molecular e de afinidade entre Biotina e Neutravidina. Este arranjo pode ser aplicado à medição, sem marcadores, com SPR, como também a outros métodos de transdução, como imunofluorescência (Figura 4.22). A utilização de camadas auto-organizadas (SAM) para cobertura da superfície sensora, é em geral adequada para impedir ligações não específicas na superfície de ouro. No caso do uso da biotina como camada intermediária entre o ouro e a avidina, uma opção seria usar uma camada mista de peptídeos tiol-PEG com a biotina na ponta. Um fluxo sobre a superfície de ouro com um composto tiol de cadeia curta irá fechar pontos abertos no Au e ajudar a evitar contatos indesejados entre analito e a superfície do sensor.

Uma outra opção, escolhida aqui, foi o uso de uma camada auto-organizada monomolecular de biotina sulfonada (BS).

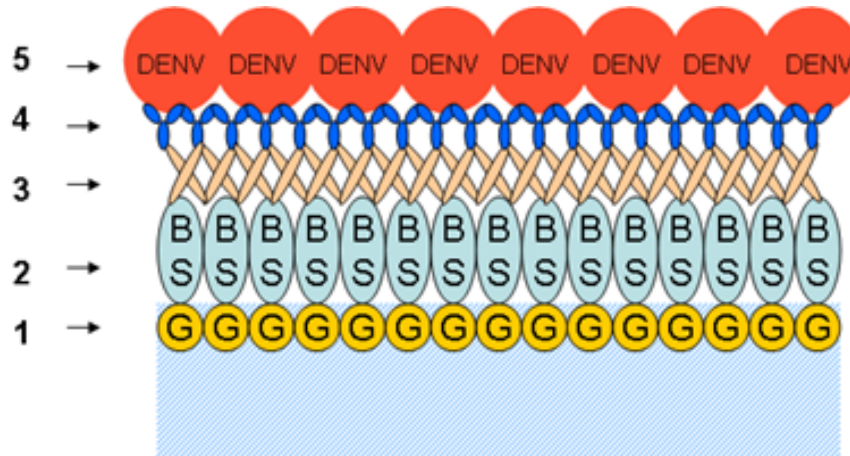


Figura 4.22: Funcionalização ideal para um imunossensaio onde: 1) Substrato de vidro ou polímero coberto com uma fina camada de ouro (G) de 50 nm. 2) Camada (auto-organizada) monomolecular de Biotina sulfonada (BS). 3) Camada monomolecular de Neutravidina (NA), de $\sim 5\text{nm}$ de espessura. 4) Camada Monomolecular de Anticorpos, conjugados com Biotina (ABBi) 5) Vírus DENV, tamanho de aproximadamente 50 nm.

As camadas deste arranjo, utilizado nesta aplicação de medição sem marcadores com SPR, são descritas como se seguem, e ilustradas na Figura 4.22.

1. Um filme fino de ouro (Au) de aproximadamente 50 nm, é depositado por evaporação de metal, ou sputtering, sobre substratos de vidro ou de polímero.
2. Um filme ideal monomolecular e homogêneo de moléculas compostas de Biotina com enxofre (BS), com os átomos de enxofre gerando uma forte ligação covalente com os átomos de ouro da superfície do substrato.
3. Um filme ideal monomolecular e homogêneo de moléculas de proteína Neutravidina (NA) as quais se ligam ao filme de Biotina, que fica abaixo.
4. Um filme ideal monomolecular e homogêneo de anticorpos conjugados com Biotina (ABBi) e selecionados para o antígeno (que está sendo detectado) que se liga às moléculas de Neutravidina.
5. Um fluxo de fluido corporal diluído (por exemplo sangue, soro) é introduzido, o qual pode

conter, e transportar, uma determinada quantidade de antígenos (AG) que se ligam ao filme ABBi, que fica abaixo.

As camadas 2-4 são obtidas pela dissolução de baixas concentrações dos respectivos compostos em etanol (camada 2) e de solução aquosa de solução tampão de fosfato salina (PBS) para as camadas 3 e 4 e imersão do substratos, cobertos com ouro, nas soluções, ou através da passagem das soluções sobre a superfície, dentro da célula de fluxo. Normalmente uma etapa de lavagem, usando solução PBS ou detergente é aplicada entre as camadas de imobilização do filme, para remover ligações fracas ou excesso de substâncias. A superfície limpa de 50 nm de filme fino de ouro é pré-condição necessária para uma eficiente ativação do *chip* óptico SPR, descartável. Possíveis contaminações orgânicas e inorgânicas sobre a superfície de ouro são removidos por armazenagem durante um período de 3 horas em solução de peróxido de hidrogênio a 30% . A superfície depois é enxaguada com água desionizada, é secada com nitrogênio, e novamente enxaguada com etanol a 100%.

O protocolo de funcionalização, pode ser descrito, resumidamente da seguinte maneira:

1. Proceda-se à etapa de limpeza da superfície de ouro sensora, S, do *chip* polimérico.
2. Coloca-se a superfície sensora S mergulhada na solução Sulfo-NHS-S-S-Biotin 1mM em ethanol ($\approx 500ml$) por 1 hora.
3. Lava-se a superfície S uma vez com ethanol e a conserva em solução tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline - PBS) a 4C (< 1semana).
4. Faz-se passar NeutrAvidina (NA) $20\mu g/ml$ na superfície S, através da célula de fluxo do sensor, durante 15 min. (taxa de fluxo $50\mu l/min$).
5. Lavagem com PBS (2-3min).
6. Passam-se os anticorpos Biotinilados ($10\mu g/ml$) durante 15 min.
7. Conservam-se os *chips* funcionalizados em embalagem esterilizada a $-20C$.

Condições reais de um imunoenensaio típico

Na prática, a cobertura das moléculas, θ , de todas as camadas, 1-4, é incompleta, portanto $\theta < 1$. A deposição deixa áreas livres, sem presença de AB_{Bi} (Imunoglobulinas tipo IgG ou IgM específicos para DENV) que são essenciais para a formação do complexo, deixando parte da camada NA, descoberta, exposta ao material antigênico do soro humano que é introduzido. Isto é ilustrado na Figura 4.23. Contudo, o filme Neutravidina (NA) pode também ser não homogêneo e incompleto, deixando frações do filme coberto com ouro, SB, diretamente exposto ao soro humano que é introduzido.

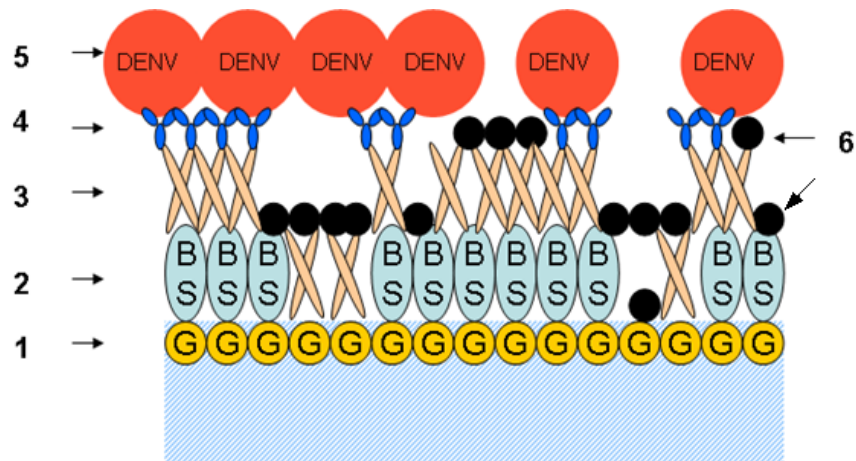


Figura 4.23: Condições reais de um imunoenensaio onde: 1)Substrato de vidro ou polímero com a camada de ouro (G) de 50 nm 2)Filme de Biotina (B) com enxofre (sulfur-S) 3)Filme de Neutravidina (NA) - 5 nm 4)Anticorpos combinados com Biotina (AB_{Bi}) 5)Vírus dengue especificamente ligados aos anticorpos AB_{Bi} 6)Ligações não específicas desconhecidas constituintes do soro (humano).

Adicionalmente às 5 etapas já mencionadas no item anterior, que compõem a estrutura do imunoenensaio, um passo 6 é acrescentado, após a introdução do soro humano ser efetivada. Neste caso, os anticorpos, sem Biotina, MABt's, são introduzidos através, novamente, de uma solução de PBS (que contém uma pequena concentração desses anticorpos). Este ensaio modificado é ilustrado na Figura 4.24. Os anticorpos, readmitidos na última etapa, se ligam, apenas, especificamente, aos antígenos capturados (por exemplo: vírus, bactéria, anticorpos ou células estranhas), formando, portanto, um segundo complexo ($AB_{Bi} - AG - AB$), como uma última camada posterior, a qual é menos sensível aos efeitos prejudiciais das ligações não específicas, uma vez que esses anticorpos em solução PBS apenas se ligam especificamente aos antígenos capturados na etapa anterior (5)

do ensaio.

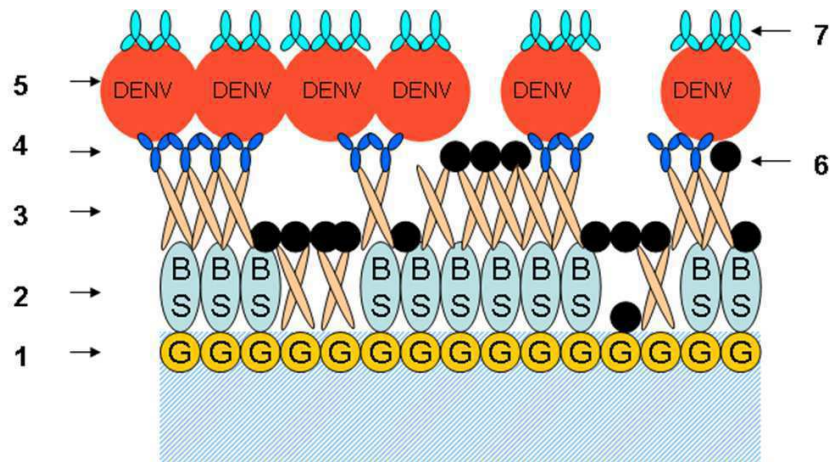


Figura 4.24: Condições do imunoensaio com a (última) camada de reforço 7: 1) Substrato de vidro ou polímero com a camada de ouro (G) de 50 nm. 2) Filme de Biotin (B) com enxofre (sulfur-S). 3) Filme de Neutravidin (NA) - 5 nm. 4) Anticorpos combinados com Biotin (ABBi). 5) Virus dengue especificamente ligados aos anticorpos ABBi. 6) Ligações não específicas desconhecidas. 7) Readmissão de anticorpos específicos com, ou sem, marcadores fluorescentes.

Materiais utilizados

Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa de um paciente de meia idade na clínica da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) em Manaus, com suspeita de infecção por dengue aguda, com 2 a 5 dias de sintomas. Várias amostras foram centrifugadas e, em seguida, congeladas e armazenadas a -70°C . Uma primeira fração de soro foi utilizada para uma pré-análise por PCR e isolamento viral. A extração do RNA viral foi realizada com o QIAmp viral RNA Mini Kit (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante. Para a transcrição reversa (RT), AccessQuick Kit™ RT-PCR System (Promega) foi usado. Depois da RT, cada ADNc foi amplificada pelo procedimento desenvolvido por Lanciotti et al [127]. As PCR Primers utilizados são consenso para D1 dengue (D1-forward). Em seguida, usando primers sorotipo-específicos durante a reação da PCR, o sorotipo dengue foi claramente identificado como DENV-2. Além disso, para confirmar o diagnóstico, a detecção da proteína NS1 viral foi realizada com o teste Platelia Dengue NS1 AG, de acordo com as instruções do fabricante. O isolamento do vírus dengue foi realizado, através do método de cultura utilizando linhagem celular oriunda do mosquito *Aedes albopictus*, C6/36, baseado no trabalho de Igarashi [128]. A técnica usada para identificação de culturas que apresentam, ou não, CPE (efeito citopático) foi a imunofluorescência indireta.

Anticorpos monoclonais específicos para cada um dos quatro sorotipos do vírus dengue foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), mais uma vez sendo identificado o DENV-2. Os anticorpos conjugados com fluoresceína foram obtidos comercialmente. Duas amostras originais de soro restantes, congeladas e armazenadas, foram diluídas com solução de PBS, para realização dos ensaios com o sistema imunológico de detecção descrito neste trabalho. O instrumento SPR utilizado para implementar o imunoenensaio é o Sensor SPR Colbi-VIR, já descrito no ítem 3.2.2 e ilustrado nas Figuras 3.21a e 3.21b. Os *chips* VIR após serem devidamente preparados foram inseridos no instrumento VIR para a realização do ensaio como ilustrado na foto do instrumento (Figura 4.25).

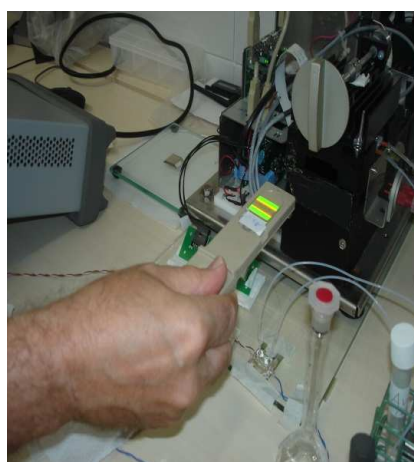


Figura 4.25: Inserção do *chip* sensor.

Ao dispositivo imunosensor composto do instrumento VIR (com o *chip* VIR), são acoplados outros instrumentos que juntos vão compor a plataforma de ensaios utilizada (Figura 3.3 do ítem 3.1.2 deste trabalho).

Substâncias químicas necessárias para realização do ensaio:

- NeutrAvidin Biotin-Binding Protein (Thermo Scientific)
- Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Scientific)
- Biotinylated IgG (conjugado biotin-MAB)
- PBS (solução salina phosphoro)
- Hipoclorito (água sanitária diluída)

- Ethanol
- Água destilada e desionizada

As amostras de soro utilizadas nos ensaios foram:

1. Amostra1 de soro sem elementos patogênicos.
2. Amostra2 de Soro positivo DENV-2 - Manaus.
3. Amostra3 de soro positivo DENV-2 -Manaus.
4. Amostra4 positiva IgG para virus dengue (sem identificação de sorotipo).
5. Amostra5 de sangue (paciente voluntário).

Para a seleção e o transporte dos fluidos foram utilizados bomba peristáltica e um conjunto de válvulas. Após ser selecionado, o fluido (água, solução tampão, solução de limpeza ou amostra, um de cada vez, e numa ordem específica), inicialmente armazenados em recipiente adequado, circula pela célula de fluxo. A célula de fluxo é basicamente constituída de: dois orifícios de acesso, um para admissão do analito e outro para sua remoção; um sistema de vedação (o-ring); e duas superfícies planas, uma das quais constituirá o arranjo multi-camada - substrato óptico/filme-metálico/bio-camada, ambiente no qual ocorrerá o fenômeno de ressonância de plasma de superfície. O sistema de aquisição de dados e controle efetua o controle do sistema, ou seja, controle das válvulas, acionamento da bomba, controle da fonte luminosa, leitura e processamento do sinal óptico de saída, controle de temperatura, visualização do sensorgrama e interface com o usuário.

Descrição do funcionamento do sistema imunossensor proposto

Para realização dos imunoenaios foram realizados os seguintes procedimentos:

- Foram utilizados SPR-*chips* poliméricos do instrumento VIR como superfície sensora.
- Foi realizada a preparação adequada e funcionalização para a imobilização dos anticorpos monoclonais biotinizados MABs.
- Foram utilizados soros provenientes da Fundação da Amazônia, Manaus, já testados pela técnica RT-PCR.

- Foram testados soros Positivo e Negativo para DENV-2
- Foi utilizada solução tampão PBS (phosphate buffered saline).
- Os *chips* foram colocados no instrumento SPR-VIR com o qual foi feito o monitoramento das mudanças do índice de refração referente a cada etapa do procedimento de funcionalização e das reações antígeno-anticorpo nos testes com amostras de soro positivo (DENV2) e nos testes com amostra de soro negativo para DENV.

Descrição dos ensaios e apresentação dos resultados

Os dados das medições durante o monitoramento da fase de funcionalização e dos ensaios de diagnóstico são apresentados na forma de sensorgramas.

Em um ensaio ideal os resultados são apresentados como duas etapas distintas: uma etapa de funcionalização e a etapa seguinte de teste da amostra. Como parte da etapa de funcionalização, há uma preparação prévia do *chip* antes de este ser inserido no instrumento, sinalizadas como etapas 1 e 2. A seguir, como indicado no sensorgrama-modelo Figura 2.6, são adicionadas substâncias necessárias à imobilização dos anticorpos nas etapas 3 e 4, além das etapas de lavagem. No teste de amostra é inserida a amostra de fluido corporal a ser testada, etapa 5, e etapas seguintes de reforço, quando descritas no protocolo de funcionalização, incluindo também etapas de lavagem. Após a última etapa de teste, a variação do índice de refração deve dar a indicação de diagnóstico positivo ou negativo, como indicado na mesma Figura 2.6.

4.3.4 Apresentação e discussão dos resultados dos imunoenaios

Etapas de fixação das camadas de imobilização

No sensorgrama, Figura 4.26, é mostrada a variação do Índice de refração em função do tempo, correspondente à etapa 3 de fixação da camada de imobilização, quando há a adição de Neutravidina ao *chip* já preparado previamente com a camada de automontagem (SAM-BS) já fixada na superfície do ouro (etapas 1 e 2) e após lavagem com PBS.

A seguir é mostrada a etapa de início de fixação dos anticorpos monoclonais biotinizados MAB_{Bi} 's.

subsubsectionEtapas dos imunoenaios para detecção

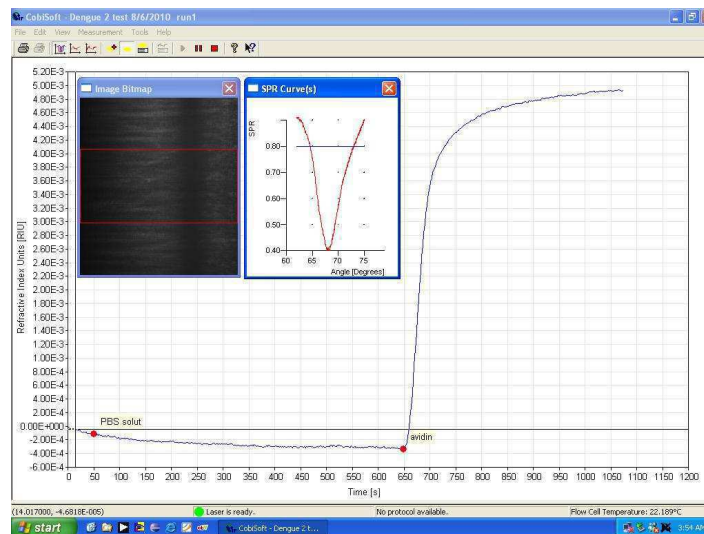


Figura 4.26: Fixação da camada de imobilização Neutravidina-Biotina.

A Figura 4.28, a seguir, ilustra as características e resultados de um imunensaio com uma indicação negativa, isto é, ausência de material viral no soro admitido. Um total de quatro amostras de controle a partir de doadores saudáveis, arbitrariamente escolhidos, foram analisadas; todos os doadores, sem qualquer sinal ou expectativa de infecções agudas por DENV.

Nos sensorgramas descritos aqui, tipicamente é mostrada uma escada com o aumento dos sinais de saída SPR, devido à imobilização consecutiva e formação das camadas de NA, MAB_{Bi} 's e soro (fluido corporal). Como mencionado acima, o traçado do índice de refração efetivo (RIU) é aproximadamente proporcional à espessura e à cobertura molecular de filmes moleculares imobilizados. Para os materiais proteicos, sob análise, variações de espessura tipicamente estão na escala nanométrica, na cobertura alcançável molecular máxima $\theta = 1$. No entanto, esta pode variar de molécula para molécula, tal como na cobertura molecular. Na fase inicial, em $t < 300$ s, apenas solução PBS flui sobre a superfície de ouro, já coberta com uma monocamada de auto-montagem de biotina sulfonada (SB). Em seguida, em $t = 300$ s, com solução Neutravidina (NA) admitida, o índice de refração (ou espessura do filme) aumenta até, aproximadamente, uma camada de NA mono-molecular, mas não necessariamente completa, ser imobilizada sobre a camada SB. Como terceiro passo, no instante $t = 900$ s, a solução com anticorpos monoclonais biotinizados, MAB_{Bi} 's, é admitida no *chip* SPR, e fixada na camada de NA abaixo, mas deixa uma mudança muito menor na RIU. Após uma lavagem adicional com PBS, em $t = 1600$ s, soro diluído a 10 : 01 (testado negativo para agentes patogênicos) é admitido, mostrando um aumento pronunciado do

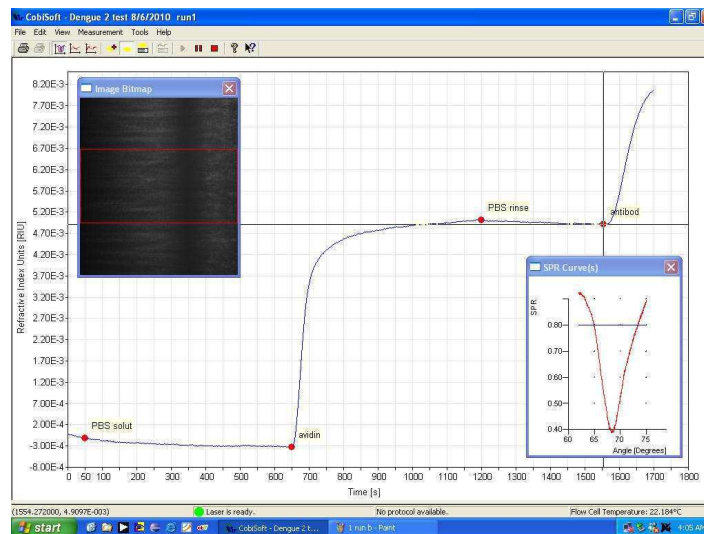


Figura 4.27: Imobilização dos MAB_{Bi} 's, anticorpos Biotinilados.

sinal, mas este cai para cerca de metade depois de enxaguar com PBS em $t = 2150$ s. Este sinal apenas pode ser originário de ligações não-específicas devido a constituintes séricos. Para confirmar a ausência de DENV, anticorpos específicos MAB's foram readmitidos em $t = 2,450$ s. Uma vez que isto não ocasionou em uma mudança no sinal de saída do instrumento, tem-se, assim, indicação clara de que não houve material viral admitido com a amostra de soro. Caso contrário a formação do complexo triplo MAB-DENV-MAB teria sido observada. Nas Figuras 4.29 e 4.30 são mostrados os sensorgramas SPR, obtidos a partir dos sinais de saída do imunossensor durante a realização de ensaios com as amostras (2 e 3) de 0,5 ml de soro que tiveram indicação **positiva** a partir de análises anteriores realizadas de RT-PCR. Os mesmos passos 1-5, necessários para uma cobertura com SB na superfície de ouro, seguidos por ligação com NA e imobilização de MABs biotinilados, foram realizados (como na Figura 5). No último passo 6, após o enxaguamento final com PBS, um aumento do sinal de saída SPR é evidente, nos três ensaios, o que indica claramente a formação do complexo triplo MAB-DENV2-MAB, e constitui **prova imunológica da presença do vírus dengue** na camada de soro (abaixo). A partir da magnitude do sinal SPR, a concentração DENV sobre a superfície pode ser estimada como se segue: assumindo um diâmetro médio de 50 nm por vírus, uma única partícula cobre uma área de cerca de $2,5 \times 10^{-16}m^2$. Assumindo 100% de cobertura, isto corresponde a 4×10^9 partículas virais fixadas num filme homogêneo de espessura de 50 nm em um local, ou ponto, de detecção SPR de $1mm^2$. Desde que material viral compreende proteínas capsídeas e RNA na sua estrutura, o índice de refração associado deve

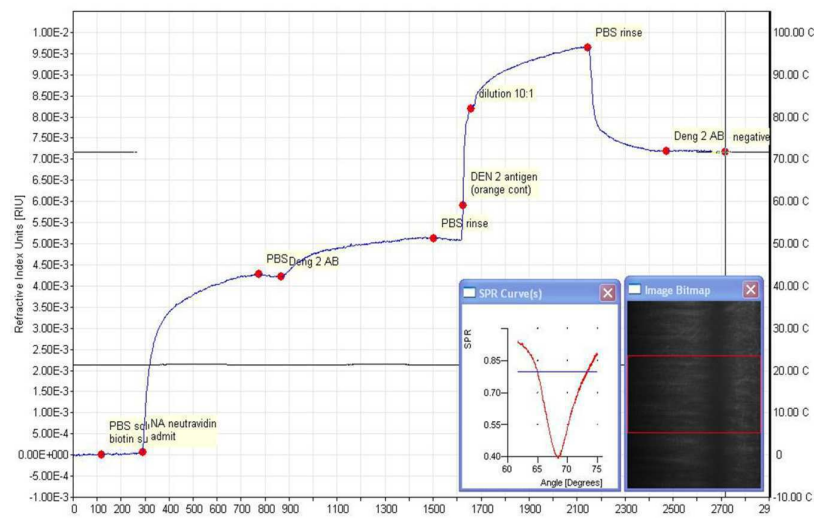


Figura 4.28: Ensaio1 - com amostra-1 serum "puro" (Manaus).

ser semelhante aos das proteínas, geralmente estando na faixa de 1,4 a 1,6 RIU. A variação total estimada do índice de refração de um filme viral de 50 nm de espessura, quando referente à camada de NA, que compreende cerca de 5 nm de espessura, então, seria entre $3 \text{ e } 5 \times 10^{-2}$ RIU. A variação associada para a formação de MAB-DENV-2-MAB após a etapa 6 é de 2×10^{-4} RIU. Com uma quantidade de 4×10^9 partículas de vírus para a camada completa, a concentração de vírus estimada, a partir dos dados da Figura 4.31, portanto, estaria dentro da faixa de $(1 - 3) \times 10^7$ partículas/mm², o que pode ser considerado um número razoável. Poderia ainda ser feito o teste RT-PCR em tempo real para se determinar a carga viral, ou seja, o número de partículas virais por amostra testada.

Na Figura 4.31a é mostrada uma imagem obtida a partir de um microscópio de força atômica (MFA), da superfície de ouro do *chip*. Na figura 4.31b são observadas imagens do vírus tomada a partir da ampliação da Figura 4.31a. Os DENV revelam forma esférica e exibem um diâmetro médio de 50nm, como mostrado em [15]. Uma área de 100mm^2 foi digitalizada com alta resolução. Variações topográficas são realçadas. A densidade de vírus é estimada um pouco menor do que o obtido a partir dos dados do sensor SPR, para cerca de 3×10^6 partículas. A partir de duas amostras positivas independentemente testadas (por RT-PCR), ambas foram determinadas **positivas** utilizando-se o dispositivo imunossensor desenvolvido. Além disso, a partir de quatro amostras de sangue (soro) declaradas negativas nenhuma foi determinada falsa positiva. Ambas as taxas de testes falso-positivo e negativo e do limite de detecção do nosso método não são ainda

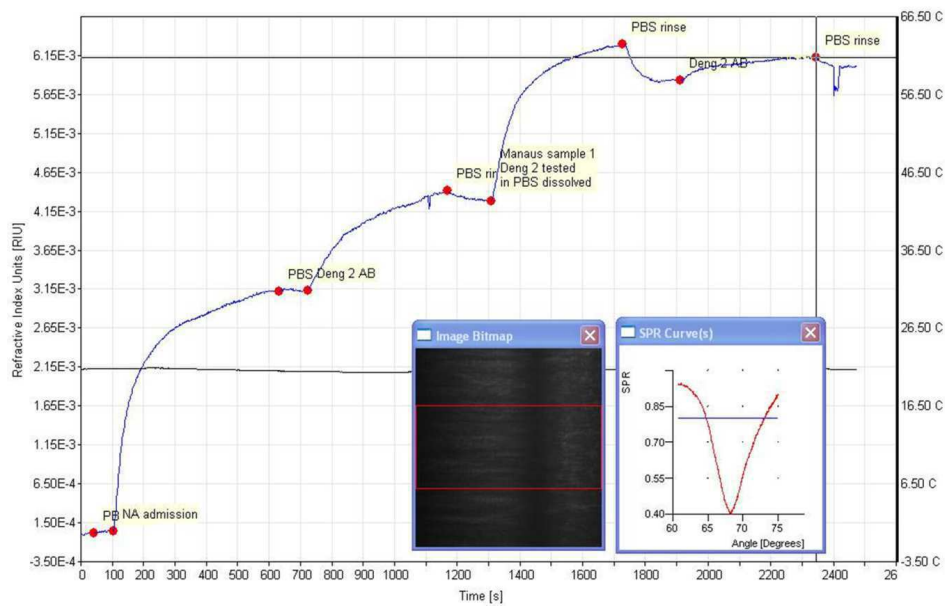


Figura 4.29: Ensaio 2. Resultado do teste com amostra-2 positiva para o DENV-2.

exatamente conhecidos, mas se avalia ser cerca de 10 a 20% da concentração de vírus, estimado a partir da Figura 4.31.

Discussão dos resultados dos imunoenaios

Os resultados do presente trabalho indicam, claramente, que com a abordagem desenvolvida de captura dos antígenos e a partir da imobilização de anticorpos monoclonais altamente específicos, é possível se determinar a presença de vírus (antígenos) no soro de pacientes infectados. A interferência de ligações não específicas pode ser em grande parte reduzida, com novas configurações das camadas de imobilização, utilizando-se camadas orgânicas auto-organizadas (SAM) compostas por aminoácidos polares ou iônicos, derivados de um tiol orgânico curto, mais adequadas quando se usam substâncias biológicas como soro humano, contendo o analito alvo, em aplicações com imunossensor SPR. Apesar das interferências, os resultados obtidos se constituem em uma prova de conceito do método proposto para a detecção do vírus dengue. Esses resultados originaram um pedido de registro de patente [129].

A partir de duas amostras positivas independentemente testadas (por RT-PCR), ambas foram determinadas positivas utilizando-se o dispositivo imunossensor desenvolvido. Além disso, a partir de quatro amostras de sangue (soro) declaradas negativas nenhuma foi determinada falsa positiva. Ambas as taxas de testes falso-positivas e negativas e do limite de detecção do método

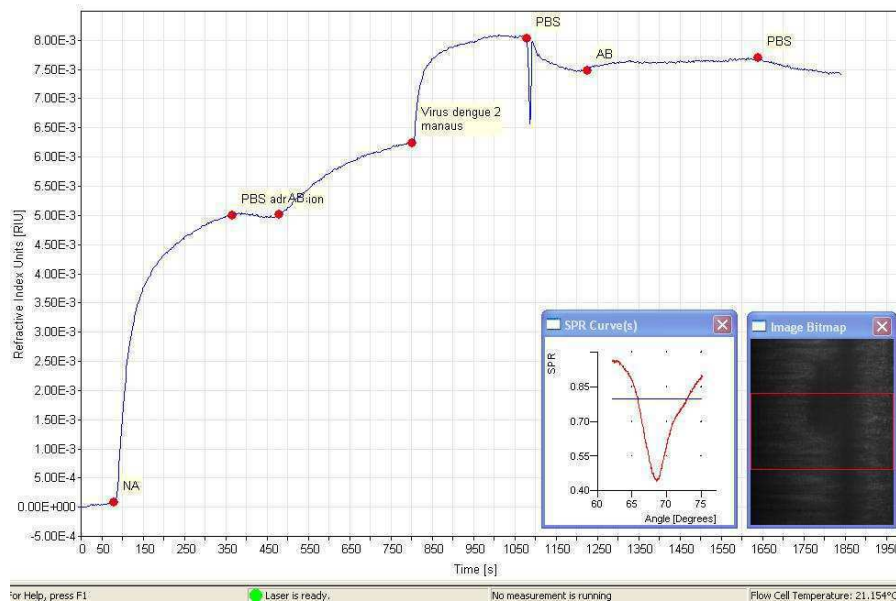


Figura 4.30: 68 Ensaio3 com amostra-3 positiva para DENV-2.

desenvolvido não são ainda exatamente conhecidas, mas se avaliam ser cerca de 10 a 20% da concentração de vírus (estimada a partir das Figuras 4.29 e 4.31).

Outros aspectos importantes de análise de robustez e métodos adequados de recuperação do *chip* e sua re-utilização não foram abordados aqui. Embora neste trabalho apenas um único sorotipo, em cada imunoensaio, possa ser detectado, com algumas modificações no sistema de detecção óptica do sensor SPR se pode testar, simultaneamente, os quatro possíveis sorotipos de dengue sobre o mesmo *biochip*. Isto pode se tornar possível pela colocação de cinco pontos de sensoriamento com diferentes anticorpos específicos MAB para DENV(1,2,3,4) em quatro pontos de detecção, e leitura simultânea de dados.

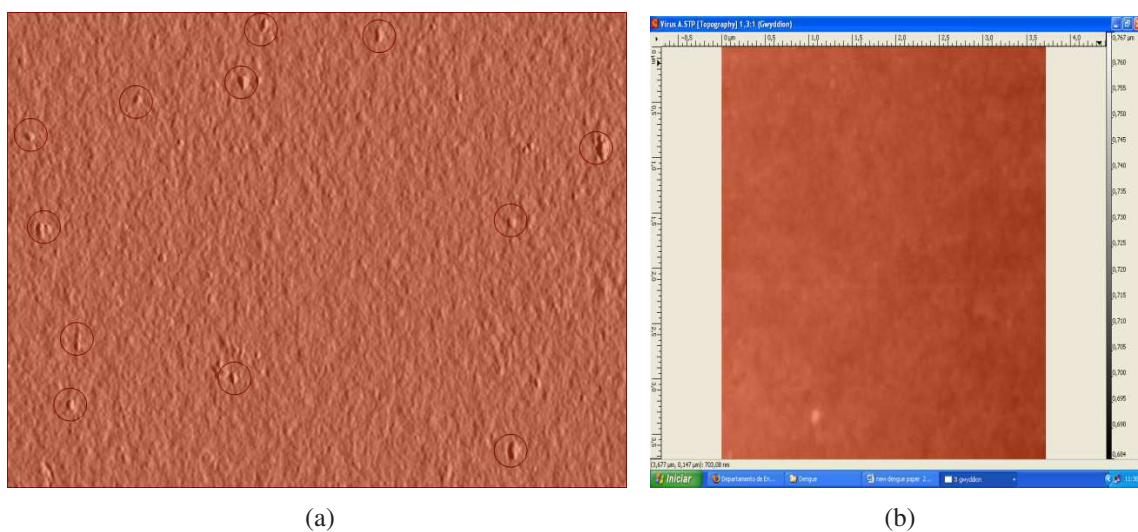


Figura 4.31: Imagens AFM da superfície de detecção a) Indicação da presença de vírus b) Parte da imagem Figura 4.31a ampliada.

Capítulo 5

Conclusão

Neste capítulo são apresentados resumos das conclusões, contribuições e perspectivas para trabalhos futuros. Os resultados dos experimentos com o sensor SPR, integrado à uma célula microfluídica, comprovam claramente que, com esse sistema, é possível se determinar **importantes parâmetros de transporte**, críticos para um sistema microfluídico, assim como **parâmetros cinéticos e termodinâmicos e de crescimento de filmes na adsorção** de substâncias relevantes para imunoenaios. As análises dos resultados permitem chegar às conclusões, descritas a seguir, da seguinte forma: primeiro, sem adsorção na superfície de detecção; segundo, quando há adsorção na superfície de interface filme de ouro-líquido.

5.1 Determinação dos parâmetros de transporte sem adsorção na superfície de detecção

Foi desenvolvido um novo método, que apresenta maior precisão e sensibilidade que os métodos conhecidos, para determinação de parâmetros de transporte. A margem bem definida na detecção de mudança de índice de refração, proporcional à variação de massa (concentração ou espessura) na camada de interface metal-dielétrico, de aproximadamente 300nm, garante uma grande precisão das medidas. Consequentemente, com esse sensor SPR foi possível se determinar parâmetros de transporte indicadores de desempenho dos sistemas, com muita confiabilidade. A partir da resposta temporal transitória, utilizando-se um sensor SPR, os tempos de resposta atribuídos aos fluxos, difusivo e convectivo, próximos às paredes do canal, foram determinados. Com esse

método foi possível constatar com precisão que, acima de um valor crítico da taxa de fluxo, a velocidade do fluxo convectivo, próximo às paredes do canal, claramente não obedece ao modelo de Poiseuille, de um perfil parabólico ideal, constituindo-se em evidência da presença de fluxo de escorregamento (*slip flow*). Este estudo pode contribuir para o projeto e fabricação de microcanais de alta precisão, tratados quimicamente, para otimizar as propriedades hidrofílicas ou hidrofóbicas. Esses resultados, decorrentes deste trabalho, foram publicados em [130], [131] e [132].

A partir dos tempos de resposta devidos aos fluxos, difusivo e convectivo determinados, foi desenvolvido um método experimental, utilizando-se o sensor SPR e a célula microfluídica, para medir o coeficiente de difusão mútua para solução binário aquosa. Com este método, medidas baseadas em Fick, ou na abordagem de Taylor, podem ser realizadas sem necessidade de marcadores externos, radioativos ou fluorescentes, que são frequentemente usados em sistemas microfluídicos. Também, a pequena dimensão da superfície sensível de sensoriamento não causa interferência com o processo de difusão. Ainda mais, essa técnica experimental direta, livre de marcadores, é uma boa alternativa aos métodos clássicos, especialmente na presença de uma forte dependência da composição. O método proposto é relativamente rápido para gradientes de concentração muito pequenos, e quando perturbações convectivas são negligenciáveis. Em contraste, os métodos clássicos de célula interferométrica e diafragma são lentos e, normalmente, requerem o uso de gradientes de concentração de grande porte. Além disso, se baseia em medições de tempos de difusão transitórios relativamente fáceis de executar e nas relações bem conhecidas de Fick e Taylor. A precisão desejada, em grande parte, depende da relação instrumental sinal-ruído e características de deriva térmica. O tempo de resposta rápido e uma alta sensibilidade favorece o método proposto em comparação com as abordagens disponíveis macroscópicas e microscópicas. Acoplado ao método experimental, um modelo de simulação numérica também é utilizado. Os resultados experimentais estão de acordo com os resultados quantitativos obtidos com o modelo de simulação numérica. Conclui-se, portanto, que foi desenvolvido um método experimental que utiliza um sensor SPR acoplado a uma célula microfluídica, para medir coeficientes de difusão mútua (interdifusão) em soluções aquosas binárias, como uma boa alternativa aos métodos clássicos mais simples e de relativo baixo custo. Os resultados deste trabalho estão publicados em [133], [134].

5.2 Análise cinética e termodinâmica da adsorção na superfície de detecção

Como parte essencial desse estudo, foi desenvolvido um método novo de análise dos mecanismos de adsorção e interações moleculares para a seleção das substâncias mais adequadas para a camada de imobilização, do volume de analito, e do limiar de detecção do sistema na realização de imunoenaios. O método, baseado no sensor SPR, viabiliza uma avaliação qualitativa e quantitativa das constantes cinéticas e propriedades termodinâmicas na adsorção de biotina e de proteínas que são necessárias para a detecção de afinidade em reações antígeno-anticorpo. Este se constitui em um novo método de análises com melhor desempenho, alta sensibilidade e flexibilidade analítica. Características de pequenas partículas como biotina, assim como grandes biomoléculas como avidina (Av), neutravidina (NAV), albumina sérica bovina (BSA) e soro humano (SH), em superfícies de ouro hidrofílicas foram explorados através de uma ampla faixa de concentrações de massa (CS). Os padrões de ligação diferem consideravelmente, e foram caracterizadas através da evolução temporal da cobertura da superfície ($\theta(t)$) e das taxas de crescimento, extraídas, em tempo real, pelo sistema de detecção de ressonância de plasmon de superfície.

Os resultados da análise cinética de adsorção e cobertura da superfície da biotina livre em um filme fino de ouro, explorada através do uso do dispositivo microfluídico SPR, indicam que o modelo isotérmico de adsorção Langmuir, considerando-se uma superfície de filme de ouro homogênea, pode descrever bem a cinética das ligações. As interações determinadas da biotina com a neutravidina e soro humano também confirmam propriedades idênticas da biotina livre quando dissolvida em solução aquosa. A constante de equilíbrio e a energia livre de adsorção foram determinadas. Ambos os valores estão bem inseridos na faixa de parâmetros de adsorção de alqueno-tiolato em filmes de ouro micro-cristalinos. Isso confirma um estado de ligação químico-adsorptivo, em conjunto com a possibilidade de auto-organização molecular. Ambos, Neutravidina (NA) e soro humano efetivamente são imobilizados em uma monocamada de biotina. Esses resultados estão divulgados em [135].

Um conjunto representativo de características de crescimento de filmes finos para avidina (Av), neutravidina (NAV), albumina sérica bovina (BSA) e soro humano (SH) foi apresentado. Os transientes de adsorção, determinados experimentalmente, $\theta(t)$, foram obtidos para uma faixa de

concentrações de proteína de $3nM/L < CS < 9\mu M/L$. Foram determinadas as constantes de associação/dissociação, k_a e k_d em função da concentração de proteína. A isoterma de equilíbrio de Langmuir, $\theta(C)$ foi obtida pela média de três conjuntos de dados, assim como o inverso da isoterma correspondente $\theta^{-1}(C)^{-1}$. Os valores de equilíbrio de $\theta(t)$ foram medidos, após a lavagem final de PBS para remover a fração de moléculas ligadas reversivelmente. As constantes de equilíbrio, K_{eq} e energias de ligação associadas, $-\Delta G$ foram determinadas.

Pode-se afirmar que os métodos desenvolvidos, de análise do crescimento de filmes moleculares e de monitoramento em tempo real nas superfícies metálicas, utilizando-se o sistema imunosensor SPR, constituem-se em uma ferramenta importante e valiosa para análise de comportamento de adsorção de proteínas, através da determinação dos parâmetros cinéticos e da termodinâmica de adsorção. Esses métodos podem ser usados por especialistas em áreas como biologia molecular e na medicina, para o desenvolvimento de procedimentos e técnicas para redução de ligações não específicas que podem causar, por exemplo, trombozes ou interferências indevidas. Questões importantes sobre mecanismos complexos de interações moleculares de proteínas precisam ser mais investigadas visando à otimização das camadas de imobilização para os imunossaios. Os sensores que têm como princípio a detecção direta sem marcadores, são mais sensíveis à ligações não específicas e portanto o método de análise da cinética de adsorção de proteínas, desenvolvido neste trabalho, pode contribuir para a otimização e surgimento de novas técnicas para melhorar a eficiência desses sensores. O efeito da difusão, não foi levado em conta na análise com os modelos de adsorção, devido ao tempo de difusão ser muito pequeno (em relação ao de adsorção) devido à pequena dimensão da altura da célula microfluídica.

Como exemplo de aplicação das análises dos mecanismos de adsorção foram realizados imunossaios para determinação de afinidade entre os anticorpos monoclonais MAB-DENV2, importados, e os DENV-2 isolados no Brasil. Os resultados obtidos constituem uma prova de conceito do método para detecção e identificação do vírus dengue, baseado na forte atração entre a biotina e a avidina, e na especificidade da interação antígeno-anticorpo.

5.3 Síntese das conclusões

Essas conclusões podem ser resumidas nos seguintes ítems:

1. Sem adsorção na superfície de detecção:

- Com o método para determinação de parâmetros de transporte, como tempos de resposta dos fluxos difusivo e convectivo, foi possível verificar, com precisão, distorções do modelo de Poiseuille: evidência de fluxo de escorregamento nas paredes do microcanal.
- Com o método desenvolvido para determinação do coeficiente de difusão de substâncias moleculares baseado na Lei de Fick e de Dispersão de Taylor, e com apoio de simulação computacional, se comprovou a eficiência do sistema microfluídico SPR ao se comparar os resultados obtidos com os disponíveis na literatura.

2. Com adsorção na superfície de detecção:

- Método de análise de adsorção e interações moleculares através de monitoramento em tempo real da evolução do crescimento de filmes finos (cobertura) de substâncias moleculares baseado no modelo adaptado de adsorção de Langmuir.
- Determinação das constantes de equilíbrio, de adsorção e dessorção (K_{eq} , k_a , k_d) e da energia (ΔG_{ads}) de adsorção da biotina e de proteínas globulares (A_v , N_{av} , BSA) e soro humano a partir da curva da cobertura, em função da concentração, baseada no modelo de adsorção de Langmuir.
- Verificação da aplicabilidade da solução por aproximação exponencial do modelo de Langmuir para análise de ligações irreversíveis na adsorção de biotina (e de outras moléculas pequenas $\approx 1nm$).
- Como exemplo de aplicação do estudo de adsorção foi proposto um novo método para detecção do vírus DENV, com o imunossensor SPR, que realiza medições em tempo real, utilizando MABt's como elemento sensor.
- Os resultados obtidos se constituem claramente em uma prova de conceito de um método inovador de detecção, com ênfase para vírus DENV, que alia as vantagens de um sistema microfluídico com as do sensor SPR.

5.4 Contribuições

Com esse trabalho foram desenvolvidos novos métodos experimentais, utilizando-se um sensor de ressonância de plasmon de superfície integrado a uma célula microfluídica, quais sejam:

- Método para avaliação quantitativa da velocidade de escorregamento (*slip-flow*) nas paredes do canal microfluídico quando não há adsorção na superfície do sensor.
- Método para determinação do coeficiente de difusão de substâncias moleculares, sem adsorção na superfície de detecção.
- Método para determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos na adsorção na superfície de ouro.
- Método de análise do crescimento de filmes na adsorção de pequenas moléculas e de proteínas globulares.

5.5 Perspectivas de trabalhos futuros

Para se levar em conta a existência da velocidade de escorregamento (*slip-flow*) nas paredes do canal microfluídico, deve-se buscar a solução da equação de Navier-Stokes incluindo um termo referente a esse escorregamento. Esse estudo, com suporte de modelagem computacional, pode aprofundar o conhecimento sobre a relação entre a velocidade de escorregamento e outros parâmetros de transporte envolvidos, e assim contribuir para o projeto e fabricação da superfície de um microcanal onde o escorregamento seria maximizado, sendo uma vantagem para algumas aplicações práticas.

O novo método desenvolvido para determinação do coeficiente de difusão, D , pode ser otimizado com um estudo do comportamento do dispositivo SPR e do coeficiente D com a temperatura e aplicação do método a outras substâncias de interesse.

Utilizando-se os métodos desenvolvidos, neste trabalho, baseado no Modelo de Langmuir, para a análise dos mecanismos de adsorção de substâncias relevantes para imunoenaios, como proteínas, é possível se investigar, com um maior aprofundamento, a evolução da taxa de crescimento da cobertura na superfície do filme fino (ouro), e tentar identificar quais, entre os modelos

de adsorção conhecidos, os que mais se aproximam do comportamento de adsorção de cada proteína. Através da correlação com outros modelos matemáticos de adsorção e comparação de aplicações desses modelos, podem-se extrair características importantes desse processo. Baseando-se nesse conhecimento pode-se viabilizar a redução de interferências indevidas, como ligações não específicas dessas proteínas. Também podem ser feitos experimentos com um número maior de proteínas e de outras substâncias relevantes para sistemas de diagnóstico.

Para a continuação do desenvolvimento do dispositivo imunossensor, em especial, para a detecção do vírus dengue, é necessário se realizar um estudo estatístico de avaliação do método e de desempenho do sistema. É necessário também se efetuar um estudo comparativo de diferentes configurações para a camada de imobilização dos anticorpos (ou antígenos) na superfície sensora com o objetivo de identificar qual a que melhor atende ao requisito de redução das interferências por ligações não específicas. Muitos ensaios são necessários ainda para determinação da sensibilidade, seletividade e interferência cruzada para o sistema proposto de detecção do vírus dengue, e construção da curva de calibração. Para isso torna-se necessário o domínio de toda a cadeia tecnológica para extração de proteínas necessárias à produção de anticorpos viabilizando a sua produção no país, com menor de custo.

Referências Bibliográficas

- 1 WEIBEL, Douglas B; WHITESIDES, George M. Applications of microfluidics in chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, n. 6, p. 584 – 591, 2006.
- 2 JANASEK, D; FRANZKE, J; MANZ, A. Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, v. 442, p. 374–380, July 2006.
- 3 WEIGL, Bernhard H; YAGER, Paul. Microfluidic diffusion-based separation and detection. *Science*, v. 283, n. 5400, p. 346–347, 1999.
- 4 CHATTERJEE, A.N; ALURU, N R. Combined circuit/device modeling and simulation of integrated microfluidic systems. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, v. 14, n. 1, p. 81–95, Feb 2005.
- 5 LIMA, Fabio Rocha; CRODA, Mariana Garcia; MUNIZ, Daniella Araujo; GOMES, Isabella Trausula; SOARES, Karla Roberta de Moraes; CARDOSO, Monique Rodrigues; MARQUES, Angela; TAURO, Raquel Luciana; CRODA, Julio. Evaluation of the traditional and revised World Health Organization classifications of dengue cases in Brazil. *Clinics, Hospital das Clinicas, Universidade de Sao Paulo, USP.*, 68, n. 10, p. 1299–1304, 2013.
- 6 DUTTA, Debashis; RAMACHANDRAN, Arun; JR, David T Leighton. Effect of channel geometry on solute dispersion in pressure-driven microfluidic systems. *Microfluidics and Nanofluidics*, v. 2, n. 4, p. 275–290, 2006.
- 7 MAHULIKAR, S P; HERWIG, H. Physical effects in laminar microconvection due to variations in incompressible fluid properties. *Physics of Fluids*, v. 18, n. 7, jul 2006.
- 8 PSALTIS, Demetri; QUAKE, Stephen R; YANG, Changhuei. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature*, v. 442, n. 7101, p. 381–386, 2006.
- 9 CRAIGHEAD, H. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature*, v. 442, n. 7101, p. 387–393, July 2006.
- 10 SHINOHARA, Kyosuke; SUGII, Yasuhiko; AOTA, Arata; HIBARA, Akihide; TOKESHI, Manabu; KITAMORI, Takehiko; OKAMOTO, Koji. High-speed micro-piv measurements of transient flow in microfluidic devices. *Measurement Science and Technology*, v. 15, n. 10, p. 1965, 2004.

- 11 KUMBHAT, Sunita; SHARMA, Kavita; GEHLOT, Rakhee; SOLANKI, Aruna; JOSHI, Vinod. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 52, n. 2, p. 255 – 259, 2010.
- 12 MCDONNELL, J M. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Current opinion in chemical biology*, v. 5, n. 5, p. 572–577, October 2001.
- 13 FU, Elain; RAMSEY, Stephen A; CHEN, Jingyi; CHINOWSKY, Timothy M; WILEY, Benjamin; XIA, Younan; YAGER, Paul. Resonance wavelength-dependent signal of absorptive particles in surface plasmon resonance-based detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 123, n. 1, p. 606 – 613, 2007.
- 14 WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Special Programme for research and training in tropical diseases*, World Health Organization., 2009.
- 15 YAMADA, Ken Ichiro; TAKASAKI, Tomohiko; NAWA, Masaru; KURANE, Ichiro. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology*, v. 24, n. 3, p. 203 – 209, 2002.
- 16 LIN, Chun Yu; HUANG, Chung Hao; CHEN, Yen Hsu. Classification of dengue: The clinical use of world health organization 2009 guideline. *Journal of the Formosan Medical Association*, Elsevier Taiwan, 112, n. 2, p. 61–63, Feb 2013.
- 17 FRY, Scott R; MEYER, Michelle; SEMPLE, Matthew G; SIMMONS, Cameron P; SEKARAN, Shamala Devi; HUANG, Johnny X.; MCELNEA, Catriona; HUANG, Chang Yi; VALKS, Andrea; YOUNG, Paul R.; COOPER., Matthew A. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. *PLOS, PLOS Neglected Tropical Diseases.*, v. 5, p. 1199, 2011.
- 18 VASILAKIS, Nikos; CARDOSA, Jane; HANLEY, Kathryn A; HOLMES, Edward C; WEAVER, Scott C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group, MacMillan building, 4 Crinan ST, London N1 9XW, England, 9, n. 7, p. 532–541, Jul 2011.
- 19 LEVICH, V. G. *Physicochemical Hydrodynamics*. N. J.: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1962.
- 20 SJOELANDER, Stefan; URBANICZKY, Csaba. Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 20, p. 2338–2345, 1991.
- 21 MOLDOVEANU, S; ANDERSON, J L. Amperometric response of a rectangular channel electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 175, n. 1-2, p. 67–77, 1984.
- 22 SANTHANAGOPALAN, S; WHITE, R E. Series solution to the transient convective diffusion equation for a rotating disk electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, Electrochemical Soc. Inc., v. 151, n. 8, p. J50–J53, 2004.

- 23 JENKINS, J; PRABHAKARPANDIAN, B; LENGHAUS, K; HICKMAN, J; SUNDARAM, S. Fluidics-resolved estimation of protein adsorption kinetics in a biomicrofluidic system. *Analytical biochemistry*, v. 331, n. 2, p. 207–215, August 2004.
- 24 PARK, Hojoon; PAK, James Jungho; SON, Sang Young; LIM, Geunbae; SONG, Inseob. Fabrication of a microchannel integrated with inner sensors and the analysis of its laminar flow characteristics. *Sensors and Actuators A: Physical*, v. 103, n. 3, p. 317 – 329, 2003.
- 25 SINTON, D; LI, D. Electroosmotic velocity profiles in microchannels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 222, n. 1, p. 273–283, 2003–07–30T00:00:00.
- 26 THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; BORRE, M.; NEFF, H.; PEDERSEN, H.C.; HOLZHUETER, G. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 100, n. 3, p. 298 – 308, 2004.
- 27 MELENDEZ, Jose; CARR, Richard; BARTHOLOMEW, Dwight U; KUKANSKIS, Kari; ELKIND, Jerry; YEE, Sinclair; FURLONG, Clement; WOODBURY, Rick. A commercial solution for surface plasmon sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 35, n. 1-3, p. 212 – 216, 1996.
- 28 MELENDEZ, Jose; CARR, Richard; BARTHOLOMEW, Dwight; TANEJA, Hemant; YEE, Sinclair; JUNG, Chuck; FURLONG, Clement. Development of a surface plasmon resonance sensor for commercial applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 39, n. 1-3, p. 375 – 379, 1997.
- 29 NAIMUSHIN, Alexei N.; SOELBERG, Scott D.; BARTHOLOMEW, Dwight U.; ELKIND, Jerry L.; FURLONG, Clement E. A portable surface plasmon resonance (spr) sensor system with temperature regulation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 96, n. 1-2, p. 253 – 260, 2003.
- 30 HARRIS, K R; GOSCINSKA, T; LAM, H N. Mutual diffusion coefficients for the systems water-ethanol and water propanol at 25-degrees-c. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, Royal Soc Chemistry, v. 89, n. 12, p. 1969–1974, Jun 21 1993.
- 31 PRATT, K C; WAKEHAM, W A. Mutual diffusion-coefficient of ethanol-water mixtures - determination by a rapid, new method. *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, Royal Soc. London, v. 336, n. 1606, p. 393–406, 1974.
- 32 HARRIS, K R; NEWITT, P J; DERLACKI, Z J. Alcohol tracer diffusion, density, nmr and ftir studies of aqueous ethanol and 2,2,2-trifluoroethanol solutions at 25 degrees c. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, v. 94, n. 14, p. 1963–1970, Jul 21 1998.
- 33 LIN, F Y; CHEN, W Y; HEARN, M T W. Thermodynamic analysis of the interaction between proteins and solid surfaces: application to liquid chromatography. *Journal of Molecular Recognition*, v. 15, n. 2, p. 55–93, 2002.

- 34 LIU, Min Kuang; LI, Ping; GIDDINGS, J. Calvin. Rapid protein separation and diffusion coefficient measurement by frit inlet flow field-flow fractionation. *Protein Science*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 2, n. 9, p. 1520–1531, 1993.
- 35 PLACIDI, M.; CANNISTRARO, S. Dynamic light scattering evidence of a ‘fragile’ character of protein aqueous solutions. *Chemical Physics Letters*, v. 310, n. 1-2, p. 130 – 136, 1999.
- 36 KAMHOLZ, Andrew Evan; YAGER, Paul. Molecular diffusive scaling laws in pressure-driven microfluidic channels: deviation from one-dimensional einstein approximations. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 82, n. 1, p. 117 – 121, 2002.
- 37 ISMAGILOV, Rustem F.; STROOCK, Abraham D.; KENIS, Paul J. A; WHITESIDES, George; STONE, Howard A. Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels. *Applied Physics Letters*, v. 76, n. 17, p. 2376–2378, 2000.
- 38 LIEDBERG, Bo; NYLANDER, Claes; L, Ingemar. Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 10, n. 8, p. i – ix, 1995.
- 39 LIEDBERG, B; NYLANDER, C; LUNDSTROM, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, ElsevierL Science SA Lausanne, v. 4, n. 2, p. 299–304, 1983.
- 40 HOMOLA, Jiri; YEE, Sinclair S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 54, n. 1-2, p. 3 – 15, 1999.
- 41 SLAVIK, Radan; HOMOLA, Jiri. Optical multilayers for led-based surface plasmon resonance sensors. *Applied Optics*, v. 45, n. 16, p. 3752–3759, Jun 1 2006.
- 42 CHUNG, Jiwon. *The application of surface plasmon resonance (SPR) immuno-biosensors for medical diagnosis*. Saarbrucken: UniversitÄt des Saarlandes, 2007.
- 43 SWAN, J B; OTTO, A; FELLEENZE, H. Observed retardation effects on energy of surface plasmons in thin aluminium foils. *Physica Status Solidi*, v. 23, n. 1, 1967.
- 44 OTTO, A. A New Method for Exciting Nonradiant Plasma Surface Vibration. *Physica Status Solidi*, 26, n. 2, 1968.
- 45 KRETSCHMANN, E; KROGER, E. Reflection and Transmission of light by a rough surface, including results for surface-plasmon effects . *Journal of the Optical Society of America*, 65, n. 2, p. 150–154, 1975.
- 46 BIACORE. *Applications Handbook*. Uppsala, Sweden: Pharmacia Biosensor AB, 1994. Disponível em: <www.biocore.com>.
- 47 BIACORE. *Concentration Analysis Handbook*. Uppsala, Sweden: Pharmacia Biosensor AB, 1994. Disponível em: <www.biocore.com>.

- 48 SOELBERG, Scott D; STEVENS, Richard C; LIMAYE, Ajit P.; FURLONG, Clement E. Surface plasmon resonance detection using antibody-linked magnetic nanoparticles for analyte capture, purification, concentration, and signal amplification. *Analytical Chemistry*, Amer Chemical Soc, v. 81, n. 6, p. 2357–2363, Mar 15 2009.
- 49 CHINOWSKY, Timothy M; SOELBERG, Scott D; BAKER, Paul; SWANSON, Nathaneal R; KAUFFMAN, Peter; MACTUTIS, Anthony; GROW, Michael S; ATMAR, Robert; YEE, Sinclair S; FURLONG, Clement E. Portable 24-analyte surface plasmon resonance instruments for rapid, versatile biodetection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 9-10, p. 2268–2275, Apr 15 2007.
- 50 TURNER, Anthony. Biosensors: then and now. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 3, p. 119 – 120, 2013.
- 51 DUTRA, R F; MENDES, R K; SILVA, V Lins da; KUBOTA, L T. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin t based on self-assembled monolayer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, n. 5, p. 1744–1750, 2007.
- 52 SILVA, M M S; DIAS, Ana C. M. S.; SILVA, Barbara V. M.; FILHO, Sérgio L. R.Gomes; KUBOTA, Lauro T.; F.GOULART, Marília O.; DUTRA, Rosa F. Electrochemical detection of dengue virus ns1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, John Wiley and Sons, Ltda., 2014.
- 53 CARDOSI, M F; TURNER, A P F. Recent advances in biosensors. *Annales de Biologie Clinique*, John Libbey Eurotext LTD, v. 46, n. 7, p. 479, 1988.
- 54 F.TURNER, Anthony P. Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 8, p. 3184–3196, 2013.
- 55 WILSON, George S.; GIFFORD, Raeann. Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, n. 12, p. 2388 – 2403, 2005.
- 56 ENGVALL, E; JONSSON, K; PERLMANN, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay .2. Quantitative Assay of Protein Antigen, Immunoglobulin G, by means of Enzyme-Labelled Antigen, and Antibody-coated Tubes . *Biochimica et Biophysica Acta*, Year = 1971, Volume = 251, Number = 3, Pages = 427, Publisher = Elsevier Science BV.
- 57 NYGREN, H; STENBERG, M. Immunochemistry at Interfaces. *Immunology*, Blackwell Science LTD, 66, n. 3, p. 321–327, Mar 1989.
- 58 GERVAIS, Thomas; JENSEN, Klavs F. Mass transport and surface reactions in microfluidic systems. *Chemical Engineering Science*, v. 61, n. 4, p. 1102 – 1121, 2006.
- 59 HU, Guoqing; GAO, Yali; LI, Dongqing. Modeling micropatterned antigen-antibody binding kinetics in a microfluidic chip. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 7, p. 1403 – 1409, 2007.
- 60 KARPOVICH, D S; BLANCHARD, G J. Direct measurement of the adsorption kinetics of alkanethiolate self-assembled monolayers on a microcrystalline gold surface. *Langmuir*, v. 10, n. 9, p. 3315–3322, 1994.

- 61 SCHESSLER, M H; KARPOVICH, S; BLANCHARD, G J. Quantitating the balance between enthalpic and entropic forces in alkanethiol gold monolayer self assembly. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 40, p. 9645–9651, 1996.
- 62 NORDE, W. Protein Adsorption at Solid Surfaces - A Thermodynamic Approach. *Pure and Applied Chemistry*, Blackwell Science LTD, 66, n. 3, p. 491–496, MAR 1994.
- 63 RABE, Michael; VERDES, Dorinel; SEEGER, Stefan. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 162, n. 1-2, p. 87 – 106, 2011.
- 64 THAKURTA, Sanjukta Guha; VILJOEN, Hendrik J.; SUBRAMANIAN, Anuradha. Evaluation of the real-time protein adsorption kinetics on albumin-binding surfaces by dynamic in situ spectroscopic ellipsometry. *Thin Solid Films*, v. 520, n. 6, p. 2200 – 2207, 2012.
- 65 CORDEIRO, Marli Tenorio; M, Eduardo; NOGUEIRA, Rita. *Vinte anos de evolução da dengue no estado de Pernambuco*. Recife, PE, Brasil: Editora Universitaria - UFPE, 2012.
- 66 CORDEIRO, Marli Tenorio; NOGUEIRA, Rita M; JR, E T A Marques. Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute dengue infection based on igg elisa. *PLOS ONE*, v. 4(4), n. 4945.
- 67 SANTOS, Cecilia Luiza; SALLUM, Maria Anice M.; FOSTER, Peter G; ROCCO, Iray Maria. Molecular analysis of the dengue virus type 1 and 2 in Brazil based on sequences of the genomic envelope-nonstructural protein 1 junction region. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, Scielo, v. 46, p. 145 – 152, 06 2004.
- 68 ZIDANE, Nora; DUSSART, Philippe; BREMAND, Laetitia; BEDOUELLE, Hugues. Cross-reactivities between human IgMs and the four serotypes of dengue virus as probed with artificial homodimers of domain-III from the envelope proteins. *BMC Infectious Diseases*, Biomed Central LTD, 13, JUL 1 2013.
- 69 SILVA, M.M.S.; DIAS, A.C.M.S.; CORDEIRO, M.T.; JR, E. Marques; GOULART, M.O.F.; DUTRA, R.F. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus ns1 protein. *Talanta*, v. 128, n. 0, p. 505 – 510, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014004652>>.
- 70 DIAS, Ana Carolina M.S.; GOMES-FILHO, Sergio L.R.; SILVA, M. M.S.; DUTRA, Rosa F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus {NS1} protein. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 44, n. 0, p. 216 – 221, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566312008895>>.
- 71 CAVALCANTI, Igor T.; GUEDES, Maria I.F.; SOTOMAYOR, Maria D.P.T.; YAMANAKA, Hideko; DUTRA, Rosa F. A label-free immunosensor based on recordable compact disk chip for early diagnostic of the dengue virus infection. *Biochemical Engineering Journal*, v. 67, n. 0, p. 225 – 230, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X12001866>>.

- 72 CHENG, Ming Soon; HO, Jia Shin; TAN, Cheong Huat; WONG, Jeslyn Pei Sze; NG, Lee Ching; TOH, Chee-Seng. Development of an electrochemical membrane-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of dengue virus. *Analytica Chimica Acta*, v. 725, n. 0, p. 74 – 80, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267012003820>>.
- 73 CAVALCANTI, I.T.; SILVA, B.V.M.; PERES, N.G.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; GUEDES, M.I.F.; DUTRA, R.F. A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. *Talanta*, v. 91, n. 0, p. 41 – 46, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914012000082>>.
- 74 KAMHOLZ, Andrew Evan; YAGER, Paul. Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels. *Biophysical Journal*, v. 80, n. 1, p. 155 – 160, 2001.
- 75 CULBERTSON, Christopher T; JACOBSON, Stephen C; RAMSEY, J Michael. Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices. *Talanta*, v. 56, n. 2, p. 365 – 373, 2002.
- 76 ZHOU, Yanhua; MILLER, Gregory H. Green kubo formulas for mutual diffusion coefficients in multicomponent systems. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 100, n. 13, p. 5516–5524, 1996.
- 77 R., Thevenot Daniel; KLARA, Toth; A., Durst Richard; S., Wilson George. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, v. 34, n. 5, p. 635–659, 2001.
- 78 LEE, Choongyeop; CHOI, Chang-Hwan; KIM, Chang-Jin. Structured surfaces for a giant liquid slip. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 101, p. 064501, Aug 2008.
- 79 BANGE, Adam; HALSALL, H. Brian; HEINEMAN, William R. Microfluidic immunosensor systems. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, n. 12, p. 2488 – 2503, 2005.
- 80 HENARES, Terence G.; MIZUTANI, Fumio; HISAMOTO, Hideaki. Current development in microfluidic immunosensing chip. *Analytica Chimica Acta*, v. 611, n. 1, p. 17 – 30, 2008.
- 81 AL., Martins T. D. et. *State of the Art in Biosensors - General Aspects*. Croatia: InTech, 2013.
- 82 BANULS, Maria-Jose; PUCHADES, Rosa; MAQUIEIRA, Angel. Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (io) biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 777, n. 0, p. 1 – 16, 2013.
- 83 CIMINELLI, Caterina; CAMPANELLA, Clarissa Martina; DELL'OLIO, Francesco; CAMPANELLA, Carlo Edoardo; ARMENISE, Mario Nicola. Label-free optical resonant sensors for biochemical applications. *Progress in Quantum Electronics*, v. 37, n. 2, p. 51 – 107, 2013.
- 84 FAN, Xudong; WHITE, Ian M.; SHOPOVA, Siyka I.; ZHU, Hongying; SUTER, Jonathan D.; SUN, Yuze. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 620, n. 1-2, p. 8 – 26, 2008.

- 85 HOA, X.D.; KIRK, A.G.; TABRIZIAN, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n. 2, p. 151 – 160, 2007.
- 86 KURIHARA, Kazuyoshi; SUZUKI, Koji. Theoretical understanding of an absorption-based surface plasmon resonance sensor based on kretschmann's theory. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 3, p. 696–701, 2002.
- 87 GUYTON, Arthur C. *Tratado de Fisiologia MÃ'dica*. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2011.
- 88 MAHONEY, R.T.; FRANCIS, D.P.; FRAZATTI-GALLINA, N.M.; PRECIOSO, A.R.; RAW, I.; WATLER, P.; WHITEHEAD, P.; WHITEHEAD, S.S. Cost of production of live attenuated dengue vaccines: A case study of the instituto butantan, sao paulo, brazil. *Vaccine*, v. 30, n. 32, p. 4892 – 4896, 2012.
- 89 COLLER, Beth-Ann G; CLEMENTS, David E. Dengue vaccines: progress and challenges. *Current Opinion in Immunology*, v. 23, n. 3, p. 391 – 398, 2011.
- 90 MURRELL, Sarah; WU, Suh-Chin; BUTLER, Michael. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 2, p. 239 – 247, 2011.
- 91 GUY, Bruno; BARRERE, Beatrice; MALINOWSKI, Claire; SAVILLE, Melanie; TEYSSOU, Remy; LANG, Jean. From research to phase iii: Preclinical, industrial and clinical development of the sanofi pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*, v. 29, n. 42, p. 7229 – 7241, 2011.
- 92 GIL, Eric de Souza; KUBOTA, Lauro Tatsuo; YAMAMOTO, Yoshimi Imoto. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados a quimica analitica. *Quimica Nova*, Scielo, v. 22, p. 874 – 881, 12 1999.
- 93 MARQUETTE, Christophe A.; BLUM, L J. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, n. 8, p. 1424 – 1433, 2006.
- 94 GOLDMAN, Ellen Ellen R; MATTOUSSI, Hedi; ANDERSON, George P.; MEDINTZ, Igor L.; MAURO, J. Matthew. Fluoroimmunoassays using antibody-conjugated quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 303, April 2005.
- 95 ANDERSON, G P; MERRICK, E C; TRAMMELL, S A; CHINOWSKY, T M; SHENOY, D K. Simplified avidin-biotin mediated antibody attachment for a surface plasmon resonance biosensor. *Sensor Letters*, Amer Scientific Publishers, 3, n. 2, p. 151–156, JUN 2005.
- 96 BONANNO, Lisa M; LOUISE, Lisa A De. Whole blood optical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, n. 3, p. 444–448, Oct 31 2007.
- 97 BOOZER, Christina; YU, Qiuming; CHEN, Shengfu; LEE, Chi-Ying; HOMOLA, J; YEE, Sinclair S.; JIANG, Shaoyi. Surface functionalization for self-referencing surface plasmon resonance (spr) biosensors by multi-step self-assembly. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 90, p. 22 – 30, 2003.

- 98 FALONE, S. Z.; VIEIRA, E. M. Adsorção e desadsorção do explosivo tetril em turfa e em argi-solo vermelho amarelo. *Química Nova*, Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, v. 27, n. 6, p. 849–854, 2004.
- 99 SOHN, Seungman; KIM, Dongsu. Short communication. *Chemosphere*, Elsevier Science, v. 58, n. 1, p. 115–123, 2005.
- 100 PRABHULKAR, Shradha; TIAN, Hui; WANG, Xiaotang; ZHU, Jun-Jie; LI, Chen-Zhong. Engineered proteins: redox properties and their applications. *Antioxidants and redox signaling*, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 17, n. 12, p. 1796–1822, 2012.
- 101 ADAMCZYK, Zbigniew; JASZCZOT, Katarzyna; SIWEK, Barbara; WERO, Ski Pawe. Irreversible adsorption of particles at random-site surfaces. *The Journal of Chemical Physics*, v. 120, n. 23, p. 11155–11162, 2004.
- 102 SOHN, Seungman; KIM, Dongsu. Modification of langmuir isotherm in solution systems-definition and utilization of concentration dependent factor. *Chemosphere*, v. 58, n. 1, p. 115 – 123, 2005.
- 103 CHOI, Chang-Hwan; WESTIN, K. Johan A; BREUER, Kenneth S. Apparent slip flows in hydrophilic and hydrophobic microchannels. *Physics of Fluids (1994-present)*, v. 15, n. 10, p. 2897–2902, 2003.
- 104 CHOI, Chang-Hwan; KIM, Chang-Jin. Large slip of aqueous liquid flow over a nanoengineered superhydrophobic surface. *Phys. Rev. Lett.*, American Physical Society, v. 96, p. 066001, Feb 2006.
- 105 YBERT, Christophe; BARENTIN, Catherine; COTTIN-BIZONNE, Cecile; JOSEPH, Pierre; BOCQUET, L. Achieving large slip with superhydrophobic surfaces: Scaling laws for generic geometries. *Physics of Fluids (1994-present)*, v. 19, n. 12, 2007.
- 106 INC., Nomadics (Ed.). *Operator's Manual SPR3 and SPR(U)*. Nomadics Inc, 2007. Disponível em: <www.ti.com/spreeta>.
- 107 CHINOWSKY, T.M; QUINN, J.G; BARTHOLOMEW, D.U; KAISER, R; ELKIND, J.L. Performance of the spreeta 2000 integrated surface plasmon resonance affinity sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 91, n. 1-3, p. 266 – 274, 2003.
- 108 RAUCH, J; KEHLER, W. On the molar mass dependence of the thermal diffusion coefficient of polymer solutions. *Macromolecules*, v. 38, n. 9, p. 3571–3573, 2005.
- 109 KAMHOLZ, A E; SCHILLING, E A; YAGER, P. Optical measurement of transverse molecular diffusion in a microchannel. *Biophysical Journal*, 80, n. 4, p. 1967–1972, Apr, Publisher = Biophysical Society 2001.
- 110 ANDERSON, J L; MOLDOVEANU, S. Numerical Simulation of Convective Diffusion at a Rectangular Channel Flow Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Elsevier Science SA Lausanne, 179, n. 1-2, p. 107–117, 1984.

- 111 ERICKSON, D. Towards numerical prototyping of labs-on-chip: modeling for integrated microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics*, Springer Heidelberg, 1, n. 4, p. 301–318, Oct. 2005.
- 112 NEFF, H.; ZONG, W.; LIMA, A.M.N.; BORRE, M.; HOLZHUTER, G. Optical properties and instrumental performance of thin gold films near the surface plasmon resonance. *Thin Solid Films*, v. 496, n. 2, p. 688 – 697, 2006.
- 113 MOREIRA, C.S.; LIMA, A.M.N.; NEFF, H.; THIRSTRUP, C. Temperature-dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold-water interface. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 134, n. 2, p. 854 – 862, 2008.
- 114 JOHNSON, P B; CHRISTY, R W. Optical Constants of Noble Metals. *Physical Review B*, Amer Physical Soc , 6, n. 12, p. 4370–4379, 1972.
- 115 PAIK, Woon kie; HAN, Subong; SHIN, Woon sup; KIM, Yousung. Adsorption of carboxylic acids on gold by anodic reaction. *Langmuir*, v. 19, n. 10, p. 4211–4216, 2003.
- 116 PUGLIESE, Luisa; CODA, Alessandro; MALCOVATI, Massimo; BOLOGNESI, Martino. Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 resolution. *Journal of Molecular Biology*, v. 231, n. 3, p. 698 – 710, 1993.
- 117 MORGAN, H.; TAYLOR, D.M.; D’SILVA, C. Surface plasmon resonance studies of chemisorbed biotin-streptavidin multilayers. *Thin Solid Films*, v. 209, n. 1, p. 122 – 126, 1992.
- 118 GUERROUCHE, M; KARAKASYAN, C; GAILLET, C; CANVA, M; MILLOT, M C. Immobilization of a functionalized poly(ethylene glycol) onto beta-cyclodextrin-coated surfaces by formation of inclusion complexes: Application to the coupling of proteins. *Journal of Applied Polymer Science*, 100, n. 3, p. 2362–2370, May 5 2006.
- 119 KUAN, Wen-Hui; LO, Shang-Lien; CHANG, Chia M.; WANG, Ming K. A geometric approach to determine adsorption and desorption kinetic constants. *Chemosphere*, v. 41, n. 11, p. 1741 – 1747, 2000.
- 120 CHANG, Chia M.; WANG, Ming K.; CHANG, Ta W.; LIN, C.; CHEN, Yih R. Transport modeling of copper and cadmium with linear and nonlinear retardation factors. *Chemosphere*, v. 43, n. 8, p. 1133 – 1139, 2001.
- 121 YAM, Chi-Ming; PRADIER, Claire-Marie; SALMAIN, Michele; MARCUS, Philippe; JAOUEN, Gerard. Binding of biotin to gold surfaces functionalized by self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine: Combined ft-irras and XPS characterization. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 235, n. 1, p. 183 – 189, 2001.
- 122 BAE, Young Min; OH, Byung-Keun; LEE, Woochang; LEE, Won Hong; CHOI, Jeong-Woo. Study on orientation of immunoglobulin g on protein g layer. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, n. 1, p. 103 – 110, 2005.

- 123 NORDE, W. The behavior of proteins at interfaces, with special attention to the role of the structure stability of the protein molecule. *Clinical Materials*, v. 11, p. 85 – 91, 1992. Biologically Modified Polymeric Biomaterial Surfaces.
- 124 SU, Xiaodi; WU, Ying-Ju; KNOLL, Wolfgang. Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying {DNA} assembly and hybridization. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, n. 5, p. 719 – 726, 2005.
- 125 ADAMCZYK, Z; SENGER, B; VOGEL, J C; SCHAAF, P. Irreversible adsorption/deposition kinetics: A generalized approach. *The Journal of Chemical Physics*, v. 110, n. 6, p. 3118–3128, 1999.
- 126 FERREIRA., G. P. Climbing the steps of viral atomic force microscopy: visualization of dengue virus particles. *Journal of Microscopy*, Blackwell Publishing Ltd, 231, n. 1, p. 180–185, 2008.
- 127 AL, R. S. Lanciotti et. Origin of the west nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern united states. *Science*, v. 286, n. 5448, p. 2333–2337, December 1999.
- 128 IGARASHI, Akira. Isolation of a single's aedes albopictus cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *Journal of General Virology*, v. 40, n. 3, p. 531–544, 1978.
- 129 A. M. N. Lima, H. Neff, F.C.C.L. Loureiro e E. Melcher. "Patente de invenção: Método e dispositivo imunológico para diagnóstico de doenças infecciosas e detecção de bio-marcadores em fluidos corporais". 2011, BR PI 1100855-5.
- 130 NEFF, Helmut; LIMA, Antonio Marcus Nogueira; LOUREIRO, Fernanda Cecilia Correia Lima; ALMEIDA, Luiz Alberto Luz de. Transient response analysis and modeling of near wall flow conditions in a micro channel: evidence of slip flow. *Microfluidics and Nanofluidics*, Springer Heidelberg, 3, n. 5, p. 591–602, Oct 2007.
- 131 LOUREIRO, Fernanda Cecilia Correia Lima; LIMA, Antonio Marcus Nogueira; NEFF, Helmut. Optical monitoring of micro fluidic flow conditions, employing surface plasmon resonance sensing. In: Arcoumanis, C and Grattan, KTV (Ed.). *Third International Conference on Optical and Laser Diagnostics (ICOLAD 2007)*. [S.l.]: IOP Publishing LTD, 2007. (Journal of Physics Conference Series, 85), p. U171–U178.
- 132 MOREIRA, C S; NETO, A G S Barreto; OLIVEIRA, L C; LIMA, A M N; LOUREIRO, F C C L; NEFF, H. A Low-cost autosampler for Surface Plasmon Resonance Biosensor Platforms. In: *XIX IMEKO World Congress: Fundamental and Applied Metrology, Proceedings*. [S.l.]: IMEKO, 2009. p. 1620–1624.
- 133 LOUREIRO, F.C.C.L.; NETO, A.G.S. Barreto; MOREIRA, C.S.; LIMA, A.M.N.; NEFF, H. A method for determining the mutual diffusion coefficient of molecular solutes based on surface plasmon resonance sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 154, n. 2, p. 129 – 136, 2011.

134 LOUREIRO, F.C.C.L.; NETO, A.G.S. Barreto; LIMA, A.M.N.; MOREIRA, C.S.; TEJO, F. Molecular transport and mutual diffusion measurement method in a micro-fluidic system, based on surface plasmon resonance spectroscopy. *Procedia Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 1099 – 1102, 2009.

135 LABORDE, H.M.; LIMA, A.M.N.; LOUREIRO, F.C.C.L.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Adsorption, kinetics and biochemical interaction of biotin at the gold-water interface. *Thin Solid Films*, v. 540, n. 0, p. 221 – 226, 2013.